Life Science & Biotechnology

Vol.50

Staff

발 행 이동근
책임편집 엄은지
편 집 배상우, 황경훈, 문미란, 최유미
디 자 인 유은정
발 행 처 다카라코리아바이오메디칼(주)
주 소 153-779 서울특별시 금천구 가산디지털2로 108 뉴티캐슬 601호
tel / fax 02-2081-2510 / 02-2081-2500
homepage http://www.takara.co.kr

MicroRNA의 이해와 LNA

What is microRNA?

MicroRNA(약칭 miRNA)는 약 22개 nucleotide로 이루어진 non-coding RNA로 유전자 발현을 조절하는 역할을 한다. 이 microRNA는 유전자의 전사 후post-transcription 단계에서 작용하며, 포유류의 경우 유전자의 60% 정도가 microRNA에 의해 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. MicroRNA는 다양한 생체 내 프로세스에서 중요한 역할을 하며 암, 심장 질환, 신경관련 질병에 연관이 있는 것으로 밝혀졌다.

MicroRNA 연구

MicroRNA는 1993년 Victor Ambros 연구진이 *C. elegans*에서 *lin-14*를 연구하는 과정에서 발견하였다. 이들은 LIN-14 단백질이 *lin-14* 유전자가 코딩하는 짧은 RNA에 의해 조절되는 것을 밝혀냈다. *lin-14* 유전자로부터 생성된 61 nt의 precursor가 22 nt RNA로 성숙되고, 이 22 nt RNA는 *lin-14* mRNA의 3' UTR에 있는 서열과 일부분 상보적인 서열을 포함하고 있었다. 이들 서열의 일부 상보성으로 *lin-14* mRNA가 LIN-14 단백질로 translation 되는 것이 저해되었다. 당시에는 이런 연구 결과가 *C. elegans*와 같은 선충류의 특이한 성질이라고 여겨졌지만, 결과적으로 *lin-4* small RNA가 최초의 microRNA로 밝혀지게 된 것이다.

최신 miRBase(Release 20, June 2013)에 보고된 바에 의하면 24,521개의 microRNA가 밝혀졌고, microRNA 연구가 빠르게 성장하고 있는 것을 확인할 수 있다. 그러나 대부분의 microRNA 기능은 여전히 밝혀지지 많은 상태이다.

miRBase: microRNA database (www.mirbase.org)

miRBase database는 발표된 microRNA 서열과 annotation을 검색할 수 있는 database이다. miRBase Sequence database는 microRNA transcript의 predicted hairpin portion 뿐만 아니라 mature microRNA의 위치와 서열에 대한 정보를 제공한다. Hairpin과 mature 서열로 검색 및 브라우징이 가능하고, microRNA 이름, 키워드, reference 및 annotation으로도 검색할 수 있다. 모든 서열 및 annotation data는 다운로드 가능하다.

MicroRNA 생성

MicroRNA 유전자는 RNA polymerase II에 의해 전사되어 large primary transcripts(pri-microRNA)가 되고, pri-microRNA는 RNase III 효소인 Drosha를 포함한 단백질 복합체에 의해 약 70 nt 길이의 precursor microRNA(pre-microRNA)가 된다. pre-microRNA는 세포질로 이동하고 두번째 RNase III 효소인 DICER에 의해 약 22 nt의 mature microRNA가 된다. Mature microRNA는 ribonuclear particle로 들어가 RNA-induced silencing complex인 RISC가 되고, 여기서 microRNA가 mRNA의 타겟 사이트에 결합하여 translation을 저해하거나 타겟 mRNA를 분해함으로써 gene silencing이 진행된다(그림 1).

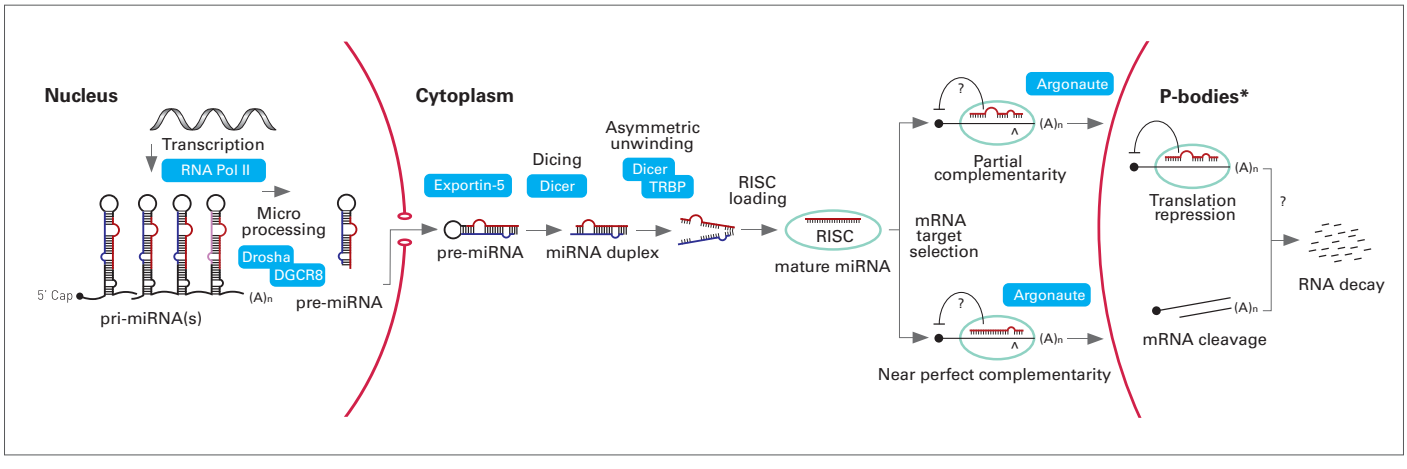


그림 1. MicroRNA biogenesis. Based on Wienholds and Plasterk, FEBS Letters 2005, 579: 5911-5922.

* Processing bodies (P-bodies) are distinct foci within the cytoplasm of the eukaryotic cell consisting of many enzymes involved in mRNA turnover.

MicroRNA 명명

MicroRNA의 명명은 “mir”를 앞에 붙이고, 뒤에 “-“와 숫자를 넣는다. 이때 숫자는 종종 명명한 순서를 나타내기도 하는데, 예를 들어 mir-123은 mir-156보다 앞서 명명되었으며 보다 먼저 밝혀졌을 것으로 예상된다. “mir-“는 pre-microRNA를 나타내며, 대문자가 있는 “miR-“은 mature microRNA를 의미한다.

한두 개의 서열을 제외하고 거의 동일한 서열의 microRNA들은 소문자를 추가하여 명명한다. 예를 들어 miR-121a와 miR-121b는 각각의 precursor인 mir-121a와 mir-121b에서 생성되었으며 서열도 매우 유사하다.

Mature microRNA는 동일하지만 게놈상에서 다른 부위에 위치한 pre-microRNA는 추가로 “-“와 숫자를 넣어 명명한다. 일례로 pre-microRNA인 mir-121-1과 mir-121-2는 동일한 mature microRNA(miR-121)가 되지만, 게놈상에서 다른 부위에 위치해 있다.

종에 따른 microRNA의 명명은 앞쪽에 표기한다. 예를 들어 hsa-miR-123는 인간(*Homo sapiens*) microRNA, oar-miR-123는 양(*Ovis aries*) microRNA이다. ‘v’는 viral(miRNA encoded by a viral genome), ‘d’는 *Drosophila* microRNA를 의미한다.

두 개의 mature microRNA가 동일한 pre-microRNA의 서로 다른 arms (3’ arm 또는 5’ arm)에서 유래한 경우, ‘-3p’ 또는 ‘-5p’를 뒤쪽에 추가하여 명명한다. (과거에는 위와 같은 구분을 's' (sense)와 'as' (antisense)로 표기하였다). miR-142-3p는 3’ arm에서 유래한 것이고, miR-142-5p는 5’ arm에서 유래한 것이다.

MicroRNA의 명명법은 일반적으로 위와 같은 기준을 따르지만 예외의 경우도 있다.

MicroRNA 기능

MicroRNA는 cell cycle 조절과 세포사멸, 발생 및 생리학적 단계에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 줄기 세포 분화, 조혈 작용, 저산소증, 심근과 골격근의 발생, 신경 발생, 인슐린 분비, 콜레스테롤 대사, 노화, 면역 반응 그리고 바이러스 증식에도 관여한다. 배발생embryogenesis 과정 중 microRNA는 조직 특이적으로 발현하거나 특정 시기에 발현하는데, 이는 분화와 조직 특이성 유지에도 microRNA가 역할을 한다는 것을 의미한다.

MicroRNA와 유전자 발현

MicroRNA는 목적 mRNA의 3’ UTR 내의 타겟 사이트에 결합하여 단백질 합성을 억제하거나 mRNA의 분해를 유발하여 gene silencing을 유도한다. mRNA에 있는 대부분의 타겟 사이트는 microRNA 염기서열과 일부분만 상보적이기 때문에, 한 개의 microRNA는 여러 개의 다른 mRNA를 조절할 수 있다. 또한 한 개의 mRNA가 여러 microRNA에 대한 multiple binding site를 갖고 있을 수 있어서, 복잡한 유전자 조절 관계를 갖는다. 게다가 많은 microRNA는 매우 유사한 microRNA family의 일부이다.

MicroRNA 바이오마커

MicroRNA는 암, 심장병, 신경관련 질병을 포함한 여러 질병들과 관련되어 있기 때문에 질병 바이오마커로서 중요한 역할을 한다. 결론적으로 microRNA는 진단이나 예후용 바이오마커, 약물반응 예보인자로서 활발히 연구되고 있다.

MicroRNA 연구의 도전

MicroRNA 연구에는 두 가지 극복해야 할 문제점이 있다. 첫째, microRNA는 약 22 nt로 매우 짧기 때문에 기존의 DNA를 대상으로 하던 연구방법을 이용할 경우에는 microRNA를 검출할 수 있는 민감도가 떨어져 신뢰할 수 있는 데이터를 얻기가 힘들다. 둘째, microRNA family는 단일 염기 차이와 같은 높은 유사성 때문에 매우 높은 특이성과 단일 염기 mismatch 검출 능력이 있어야 한다.

Exiqon의 microRNA 연구

Exiqon은 Locked Nucleic Acid(LNA™) 기술을 적용한 첨단기술 제품과 서비스를 통해 microRNA 연구 발전을 이끌어왔다. LNA 기술이 적용된 probe, inhibitor, primer 제품은 microRNA를 타겟으로 높은 결합력과 특이성을 증가시킴으로써 microRNA 연구에서의 난점을 극복하고 있다.

MicroRNA 연구 가이드

MicroRNA 연구를 위한 온라인 가이드로 RNA 분리부터 기능 분석까지 연구 단계별로 설명이 되어 있다.

자세한 내용은 www.exiqon.com/microRNA-research-guide를 참조하세요.

What is LNA?

LNA oligonucleotide는 기존 DNA나 RNA oligonucleotide에 비해 상보적 가닥과의 높은 결합력을 보유한다. 그 결과, LNA oligonucleotide는 높은 민감성과 특이성을 나타내며, 매우 유사하거나 짧은 DNA 또는 RNA 타겟을 분석하는데 유용하다.

LNA oligonucleotide 장점

- 뛰어난 민감성 - DNA와 RNA에 비해 높은 민감도
- 균일한 검출 - GC 함량에 영향 받지 않고 모든 microRNA 검출 가능
- 높은 특이성 - 단일 염기 mismatch 검출 가능
- 높은 안정성 - *in vivo*와 *in vitro*에서 small RNA에 강한 결합력 보유
- 뛰어난 적용성 - 체액이나 FFPE 샘플에서 microRNA 검출 가능

LNA 란?

Locked Nucleic Acid(LNA™)는 강한 결합력을 가진 RNA analog로, ribose ring이 "locked" 되어 있어 Watson - Crick binding에 이상적인 구조이다(그림 2). 결과적으로 LNA를 포함한 oligonucleotide는 상보적 DNA나 RNA 가닥에 결합할 때 높은 온도에서도 안정성을 가진다. Oligonucleotide에 LNA monomer가 삽입될 때마다 이중 가닥의 melting temperature(Tm)가 2 - 8℃씩 증가하여(그림 3), 기존의 DNA 또는 RNA oligonucleotide에 비해 짧으면서도 높은 Tm값을 갖는 oligo 제작이 가능하다. 이러한 특징은 짧거나 유사성이 높은 서열을 검출할 때 매우 중요한 역할을 한다.

LNA oligonucleotide는 LNA를 일부 포함한 DNA 또는 RNA 혼합물로 구성되어 있기 때문에, oligonucleotide의 LNA 컨텐츠를 변화시킴으로써 민감성과 특이성을 최적화시킬 수 있다. Oligonucleotide에 LNA가 삽입되면 PCR, microarray와 *in situ* hybridization과 같은 hybridization을 기본으로 하는 실험에서 민감성과 특이성을 향상시킬 수 있다. 또한, GC 함량에 관계 없이 모든 서열에 대해 비슷한 결합력을 갖는 LNA oligonucleotide를 디자인할 수 있다.

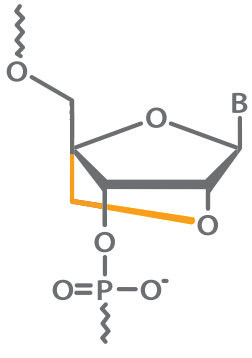


그림 2. The structure of LNA. The ribose ring is connected by a methylene bridge (orange) between the 2'-O and 4'-C atoms thus "locking" the ribose ring in the ideal conformation for Watson-Crick binding. When incorporated into a DNA or RNA oligonucleotide, LNA makes the pairing with the complementary strand more rapid and increases the stability of the resulting duplex.

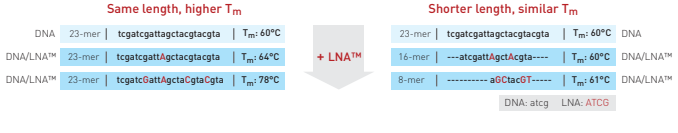


그림 3. Replace DNA with LNA for higher Tm. On the left, progressive substitution of DNA nucleotides with LNA increases the melting temperature of the oligonucleotide while maintaining the recognition sequence and specificity of the probe. On the right, LNA substitutions allow shortening of the probe while maintaining the same Tm.

Tm normalization: GC 함량에 관계 없이 강력한 검출 가능

LNA oligonucleotide는 LNA 함량을 변화시켜 Tm값과 결합력을 조절할 수 있다. 이러한 특징은 다양한 GC 함량을 갖는 짧은 서열 집단의 Tm값을 균일화할 수 있다. 또한 AT 함량이 높아 Tm값이 낮은 경우에는 더 많은 LNA를 추가하여 Tm값을 높일 수도 있다. 이를 통해 좁은 Tm값 범위를 갖는 LNA oligonucleotide들을 디자인할 수 있으며, 이는 microarray, PCR 뿐만 아니라 같은 조건에서 동시에 많은 타겟들을 특이적으로 결합하는 실험에 유용하다. Tm normalization의 효과는 DNA probe와 LNA probe를 이용하여 GC 함량이 다양한 microRNA를 검출한 비교실험에서 입증되었다(그림 4).

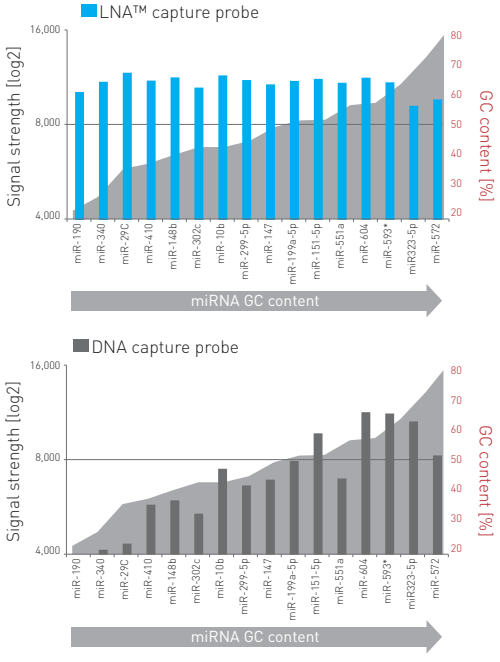


그림 4. The power of Tm normalization. The signal from DNA-based capture probes varies with GC content and results in poor detection of many microRNAs, whereas LNA probes offer robust detection of all microRNAs. Signal intensity from microarray experiments using LNA-enhanced (blue) or DNA- based (gray) capture probes. MicroRNA targets with varying GC content were added at 100amol each.

뛰어난 단일 염기 검출

단일 염기 차이를 가진 유사한 염기서열도 LNA oligonucleotide를 이용하면 검출이 가능하다. 완전히 match한 경우와 mismatch가 있는 경우의 Tm값 차이로 나타낸다. Oligonucleotide에 LNA를 삽입하면 완전히 match한 경우와 mismatch가 있는 경우의 delta Tm 값 차이를 8℃까지 증가시킬 수 있고, Tm값 차이의 증가는 microRNA family와 같이 유사한 염기서열간 차이를 식별할 수 있게 해준다.

넓은 적용 가능성

LNA에 의한 결합력 증가 효과는 LNA oligonucleotide의 침투 특성을 향상시켜 *in vivo* 연구에도 적합하다. 또한 oligonucleotide에 LNA를 삽입하면 endonuclease나 exonuclease에 저항성을 증가시켜 *in vitro* 와 *in vivo* 에서 안정성을 갖게 한다.

LNA oligonucleotide는 RNA 및 DNA와 유사한 물리적 특성(e.g. 수용성)을 가지고 있기 때문에 기존의 실험 방법에도 쉽게 적용 가능하다.

MicroRNA 연구에 적합한 LNA

길이가 짧고 GC 함량이 다양한(5 - 95%) microRNA는 기존의 DNA나 RNA oligo를 이용하는 방법으로 분석하는데 어려움이 있다. 왜냐하면 DNA나 RNA를 기초로 한 microRNA 분석 방법은 GC 함량에 따라 Tm 값이 변하기 때문에 불확실하고 안정적이지 않다. 이러한 단점 때문에 microarray profiling과 많은 microRNA를 대상으로 하는 스케일이 큰 실험이 같은 조건에서 진행될 경우 문제를 일으키게 된다.

이런 문제점들은 LNA가 포함된 oligonucleotide를 사용하면 극복 가능하다. LNA 함량을 변화시킴으로써, microRNA의 GC 함량에 관계없이 특정 Tm값을 갖는 oligonucleotide를 디자인할 수 있다. Exiqon은 LNA 기술을 이용하여 primer, probe 및 inhibitor의 Tm값을 균일화시켜 같은 조건에서도 실험이 제대로 수행되도록 하였다(그림 5).

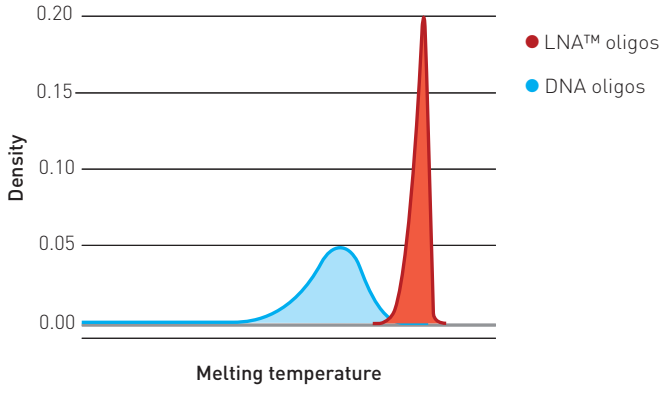


그림 5. LNA microRNA inhibitors have high uniform potency. The affinity of traditional full length microRNA inhibitors is highly influenced by the GC-content resulting in a Tm span of more than 40°C. In contrast, Exiqon's inhibitors span just 10°C around an optimal temperature.

MicroRNA 연구의 또 다른 어려움은 서열간의 매우 높은 유사성이다. 일부 microRNA family는 단일 염기 차이를 갖고 있는 경우도 있다. LNA를 포함한 primer와 probe는 서열 구별 능력이 향상되어, 매우 유사한 서열의 microRNA도 구별이 가능하다.

다양한 연구에 적용 가능한 LNA

LNA 기술은 microRNA 연구뿐만 아니라 미량이거나 염기서열이 짧고 유사한 샘플의 연구에도 적용할 수 있다(그림 6). LNA는 매우 짧은 염기서열을 이용한 연구에서도 획기적으로 검출효율을 높일 수 있으며, 특이성과 민감성을 요하는 non-coding RNA와 small RNA 연구에서도 유용하다.

LNA에 대한 자료는 www.exiqon.com/lna-technology 에서 열람 가능하다.

DNA

Real-time /quantitative PCR
SNP detection/allele specific PCR
Methylation analysis
Bead-based applications
Chromosomal FISH
Comparative genome hybridization
Proteomics of isolated chromatin segments (PICh)
Antigene inhibition
Mutagenesis

mRNA

Real-time /quantitative PCR
Microarray analysis
In situ hybridization
Northern blotting
Bead-based applications
Fluorescence activated cell sorting Isolation
Inhibition of RNA function
RNA modification (frame shifting/exon skipping
DNAzymes

ncRNA

Real-time /quantitative PCR
Microarray analysis
In situ hybridization
Northern blotting
Fluorescence activated cell sorting
Inhibition of RNA function
RNA modification (frame shifting/exon skipping

miRNA

Real-time /quantitative PCR
Microarray analysis
In situ hybridization
Northern blotting
Bead-based applications
Inhibition of RNA function

PCR based approaches
Hybridization based approaches
In vivo based approaches

그림 6. Proven LNA applications. LNA is a powerful tool in many applications where standard DNA or RNA oligonucleotides do not have sufficient affinity or specificity. The figure shows an overview of some of the LNA applications that have been used for the study of RNA and DNA.

MicroRNA 연구의 A to Z

1. MicroRNA Isolation
2. Expression Analysis Array
3. Expression Analysis qPCR
4. Localization
5. Functional Analysis

1. MicroRNA Isolation (page 7)

miRCURY RNA Isolation Kits
- Get total RNA from a wide range of sources
- Ideal for microRNA research

2. Expression Analysis Array (page 8)

miRCURY LNA microRNA Array, 7th gen - hsa, mmu & rno
- Our sensitive and specific human, mouse and rat microRNA microarray

miRCURY LNA microRNA Hi-Power Labeling Kits
- Fast and simple labeling of total RNA
- Ideal for use with Exiqon's microRNA arrays

Spike-in microRNA Kits
- Improve the quality of your array data with these synthetic microRNAs

3. Expression Analysis qPCR (page 10)

Universal cDNA Synthesis & ExiLENT SYBR Green Master Mix kits
- Optimized reagents for use with the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR system

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Primer Sets
- Individual microRNA PCR primer sets for quantification of microRNAs
- Design custom LNA primers for any small RNA online

Ready-to-Use PCR panels
- miRNome PCR panels
- microRNA Pick-&-Mix PCR panels
- Focus microRNA PCR panels

4. Localization (page 12)

miRCURY LNA microRNA Detection Probes
- Sensitive and specific probes for all microRNAs. Available with a wide variety of modifications

miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kits (FFPE)
- Kits for optimizing microRNA ISH from many sample sources
- First optimize your experiment, then use an LNA probe for your microRNA of interest

5. Functional Analysis (page 14)

miRCURY LNA microRNA Inhibitors
- Pre-designed and custom inhibitors for specific suppression of all microRNAs in miRBase and more

miRCURY LNA microRNA Power Inhibitors
- Our most potent inhibitors. Synthesized with PS backbones

miRCURY LNA microRNA Family Inhibitors
- Inhibitors of all microRNAs within a family

miRCURY LNA microRNA Target Site Blockers
- Unmatched high efficacy *in vitro* and *in vivo*
- Unrivaled performance - LNA TSBs do not catalyze RNase H-dependent mRNA degradation

1. MicroRNA Isolation

빠르고 간편하게 microRNA 연구에 적합한 total RNA 추출
miRCURY RNA Isolation Kit 시리즈

- 다양한 sample로부터 고품질의 total RNA 추출
- Exiqon의 microarray, PCR 등 다양한 downstream 실험에 적합
- 20분 만에 빠르고 간편하게 total RNA 추출
- Phenol-free 과정

Exiqon에서는 샘플 형태에 따라 아래와 같이 세 가지 제품이 있다. 샘플 타입에 적합한 kit의 선택은 그림 1에서 확인 가능하다.

- miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids : serum, plasma, urine, CSF와 같은 Biofluids 샘플로부터 풍부한 small RNA (<1000 bp) 분리
- miRCURY RNA Isolation Kit – Cell & Plant : animal cell, small tissue samples, blood, yeast, fungi, bacteria 및 식물로부터 total RNA의 추출을 위한 빠른 프로토콜을 제공
- miRCURY RNA Isolation Kit – Tissue : animal tissue sample로부터 total RNA 추출에 최적화

Sample Type	Recommended kit	RNA fraction	Recommended detection method
Serum Plasma Urine CSF Other biofluids	**miRCURY™ RNA Isolation Kit - Biofluids**	Small RNA (<1000 bp)	miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR
Cultured cells Plant Tissues Brain and Adipose Tissue* Full Blood (non-coagulating)	**miRCURY™ RNA Isolation Kit - Cell & Plant**	Total RNA	miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR or miRCURY LNA™ microRNA Arrays
Tissue	**miRCURY™ RNA Isolation Kit - Tissue**		

* For brain and adipose tissue extra Lysis Additive is required.

그림 1. Isolation kit selection guide. Select the right sample isolation kit and detection method for your samples.

miRCURY RNA Isolation Kit는 separation matrix와 같이 특유의 resin을 이용한 spin column chromatography 방법을 이용한다. Total RNA는 phenol 이나 chloroform 같은 유기용매를 사용하지 않고도 20 ~ 50 분 정도면 쉽게 추출할 수 있다. miRCURY RNA Isolation Kit는 기본적으로 아래와 같은 네 가지의 단계를 가진 샘플타입에 최적화된 프로토콜을 포함한다.

1) 세포 용해 및 단백질 침전
2) Ethanol/isopropanol 첨가와 column에 loading
3) Column 세척
4) Column으로부터 RNA elution

Biofluids Kit

miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids는 serum, plasma와 같은 생체액으로부터 RNA를 추출하기 위해 최적화한 제품이다. 시료가 생체액인 경우 제한된 양의 RNA가 포함되어 있고 PCR 저해 물질이 존재하기 때문에 microRNA 정제에 어려움이 있다. miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids는 정제 수율이 낮은 샘플을 조작하는데 최적화되었고 각종 inhibitor의 carryover 현상을 최소화하여 생체액으로부터 microRNA를 정제하는데 최적화되어 있으며, 고순도 small RNA를 높은 수율로 얻을 수 있다(그림 2).

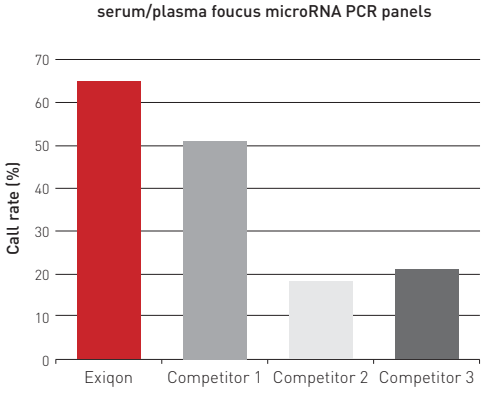


그림 2. The miRCURY RNA Isolation Kit –Biofluids allows detection of more microRNAs compared to three other column based RNA isolation kits. RNA isolations were performed from the same plasma sample, using 4 different sample preparation kits. microRNA profiling was performed using the Serum/Plasma Focus microRNA PCR panel (168 microRNA assays in total). Call rate (percent of microRNAs detected) for each kit is shown. Only assays detected as present in all 5 replicates were calculated as a call.

표 1. Recommended starting material for different organisms /sample types

	Serum/plasma	Urine	CSF	Other biofluids*
Human samples	200 µℓ	200 µℓ	200 µℓ	200 µℓ
Rodent samples	50 µℓ**	200 µℓ	Not tested	50 µℓ**
RNA eluate for PCR***	4 µℓ	4 µℓ	8 µℓ	4 µℓ

*) For subsequent qPCR analysis, start volume may need to be adjusted to keep PCR inhibitors at a minimum.
**) Add RNase-free water to keep final volume at 200 µL
***) Volume used as input in a 20 µL RT reaction using Exiqon's Universal cDNA Synthesis Kit.

Cell & Plant Kit

miRCURY RNA Isolation Kit – Cell & Plant는 Real time PCR, Microarray, Northern blotting 등의 실험에 적용 가능한 고품질의 total RNA 추출에 최적이다.

Tissue Kit

miRCURY RNA Isolation Kit- Tissue는 대부분의 동물세포로부터 RNA를 추출하는데 최적화되어 있다. 본 제품에는 Proteinase K가 포함되어 있어 섬유질을 많이 포함하는 근육조직이나 지방을 많이 포함된 뇌조직으로부터 단백질의 제거가 용이하다. miRCURY RNA Isolation Kit - Tissue는 이러한 조직 샘플로부터 고품질의 total RNA 추출이 가능하다(그림 3).

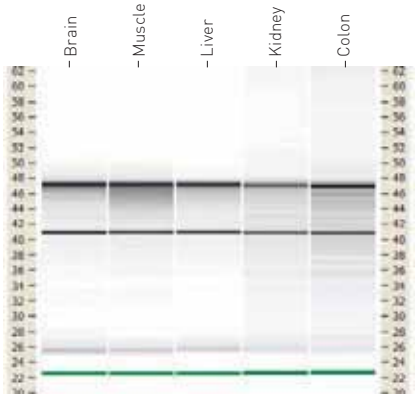


그림 3. High quality total RNA from difficult tissues. Total RNA was isolated from five mouse tissues using the miRCURY RNA Isolation Kit – Tissue. Brain and muscle tissues are usually considered difficult sources of RNA as they are very rich in lipids and fiber, respectively. However, great results were produced as seen from the average OD ratios (260/280: 1.85, 260/230: 1.7) and RIN values (8.8) of the five tissues.

2. Expression Analysis Array

LNA 기반의 정확하고 민감한 microRNA microarray

miRCURY LNA microRNA Arrays

- miRBase 19.0에 등재된 3100개의 human, mouse, rat의 microRNA capture probe
- 검증을 거친 LNA-enhanced capture probe로 검출, 특이성과 민감도 향상
- GC 함량에 관계없이 모든 microRNA를 검출 가능
- 고감도: 30ng 수준의 total RNA로부터 microRNA Profiling
- 상동성이 매우 높은 microRNA family member도 특이적으로 구별 가능
- Single color, Dual color microarray 가능

miRCURY LNA microRNA Array, 7th gene - has, mmu & rno

Exiqon의 7세대 miRCURY LNA microRNA array는 miRBase 19.0에 등재되어 있는 총 3100개의 human, mouse, rat microRNA 뿐만 아니라 이들 종에 연관된 viral microRNA까지 검출하는 Probe를 포함하고 있다. 또한 추가적으로 miRPlus human microRNA에 대한 capture probe도 포함한다.

Organism name	Organism code	Common name	In miRBase 19	Array 7th gen
Homo sapiens	hsa	Human	2042	94%
Mus musculus	mmu	Mouse	1281	90%
Rattus norvegicus	rno	Rat	723	95%

LNA capture probes의 장점

Exiqon의 microRNA array 제품은 모두 LNA-enhanced capture probe를 이용한다. LNA probe는 일반 DNA probes에 비하여 두 가지 중요한 장점이 있다(그림 4, 5).

1) High affinity – Capture probe에 LNA를 삽입하면 probe-target duplex에서 높은 값의 melting temperature (Tm) 를 얻을 수 있어 array의 특이성과 민감성을 높일 수 있다.

2) Uniform affinity – DNA capture probe와는 달리 Tm-normalized LNA probe는 microRNA의 GC 함량에 관계없이 동등한 효율로 목적 서열에 결합할 수 있다. 이는 각 probe에 삽입된 LNA의 양이나 위치에 따라 Tm 값이 달라질 수 있기 때문이다.

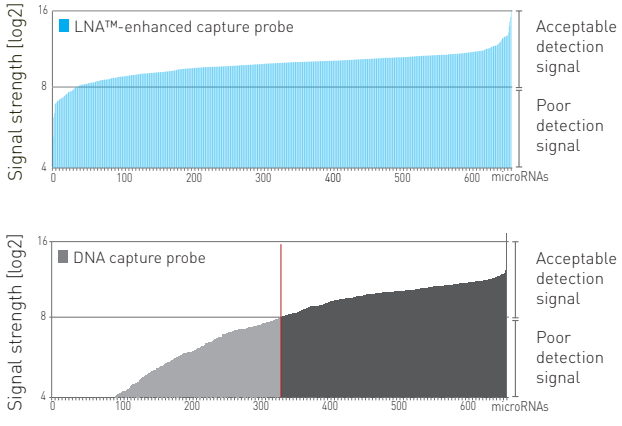


그림 4. LNA-enhanced capture probes ensure robust detection of microRNAs. With DNA-based capture probes, half of microRNAs were either undetected or poorly detected. Signal strength (log2 signal/100amol target) from 660 synthetic microRNAs hybridized to Exiqon's microarray and Supplier A's DNA-based array are compared.

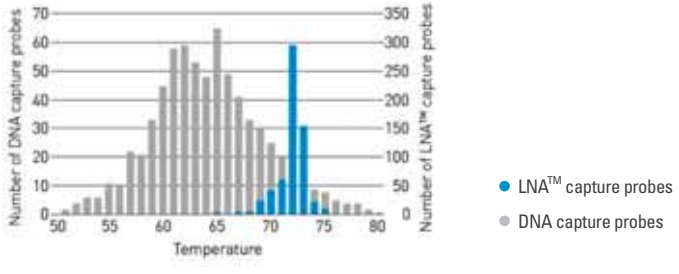


그림 5. Tm-normalized LNA capture probes. DNA capture probes (gray bars) for human microRNAs, have a Tm range of more than 30 °C and an average Tm of 64 °C (StDev 5 °C). The LNA capture probes (yellow bars) have a Tm range of only 10 °C and an average Tm of 71.5 °C (StDev=1.62 °C).

매우 높은 민감성

miRCURY LNA microRNA Hi-Power Labeling Kit와 함께 이용하면 더욱 증가된 민감성을 확인할 수 있다(그림 6). Microarray에 사용되는 LNA capture probe의 절반 이상이 ≤0.5 amol의 검출한계를 지니고 있다.

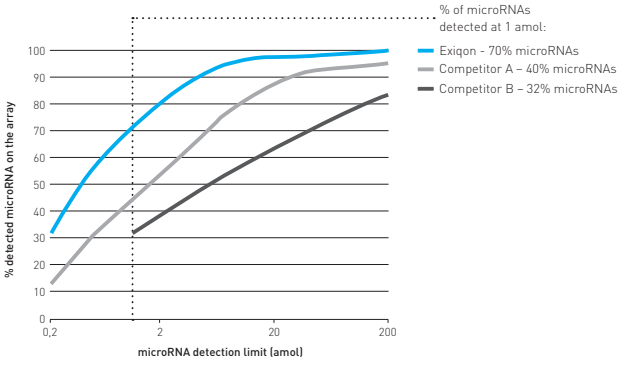


그림 6. The most sensitive array available. Due to optimally designed Tm normalized capture probes and extremely efficient labeling, the Exiqon array detects a significantly higher percentage of microRNAs than competitor arrays.

Exiqon microRNA array는 30ng 수준의 소량의 total RNA로부터 재현성 높은 결과를 얻을 수 있다(그림 7). Array의 높은 특이성 때문에 데이터 품질의 손상 없이 샘플의 양을 늘릴 수 있다. 이러한 특징은 낮은 수준으로 발현되는 microRNA를 연구하는 데 있어 중요하다.

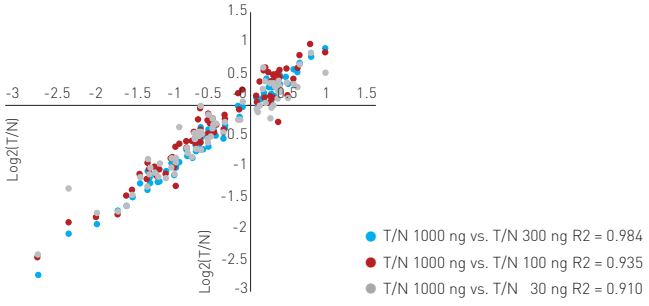


그림 7. Reliable microRNA expression profiles with as little as 30ng total RNA. Four different microarray experiments with varying amount of input RNA from oesophagus cancer (T) and normal adjacent (N) tissue were compared. A very high correlation is obtained when plotting the results from the experiment using 1000ng input RNA against those using 300, 100, and 30ng.

높은 특이성

miRCURY LNA microRNA Array는 microRNA 타겟에 대해 높은 특이성을 보유한다. Tm-normalized LNA capture probe와 최적화된 hybridization 반응 조건은 capture probe의 특이성을 상당히 증가시킨다. 그 결과 Exiqon array는 상동성이 매우 높은 microRNA family member도 구별 가능하다(표 2).

	let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e	let-7f	let-7g	let-7i
let-7a	100%	2%	17%	4%	4%	2%	1%	2%
let-7b	1%	100%	4%	1%	1%	1%	1%	1%
let-7c	0%	8%	100%	0%	1%	0%	0%	0%
let-7d	2%	2%	5%	100%	1%	0%	0%	0%
let-7e	1%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%
let-7f	6%	3%	5%	3%	3%	100%	2%	3%
let-7g	0%	0%	1%	0%	0%	1%	100%	4%
let-7i	0%	3%	0%	0%	0%	0%	2%	100%

표 2. Superior discrimination between microRNA family members. There is very little cross-hybridization between let-7 family members. The experiments were performed with synthetic let-7 spike-in microRNA (300 amol) in a background of tRNA.

데이터 품질 향상을 위한 Spike-in miRNA Kit의 적용

7th gen microRNA array는 52개의 synthetic spike-in microRNA를 포함한다. Spike-in microRNA는 array hybridization 전 labeling 단계에서 첨가되며 spike-in capture probe를 이용한 signal은 labeling과 hybridization, scanner setting, data normalization, array replicate 등의 control로 사용된다.

또한, array는 10개의 추가적인 spike-in microRNA에 대한 probe를 포함하고 있는데 이는 profiling 연구의 calibration과 control로써 사용된다.

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR로 검증

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR를 이용하여 microarray 결과를 검증할 수 있다. Ready-to-use microRNA PCR panels을 이용하면 microRNA 발현 profiling을 빠르고 쉽게 수행할 수 있다.

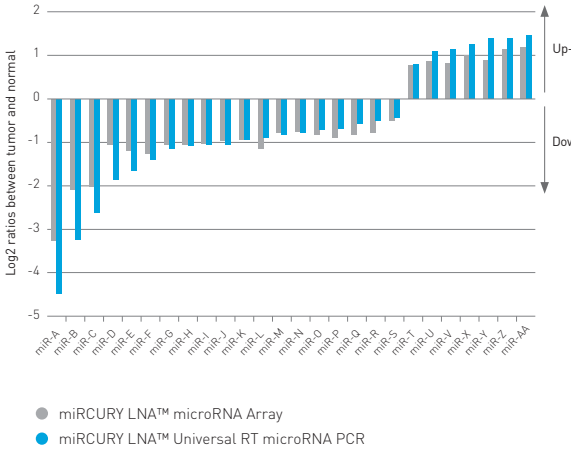


그림 8. Great correlation between microarray and qPCR results. The array data was normalized (quantile normalization) and microRNAs with log2 ratios > or < 0,5 were included in the study. The qPCR data was normalized to reference genes. Only microRNAs that were detected (Cp < 36 for all replicates) were included. A total of 26 microRNAs were included in the study.

3. Expression Analysis qPCR

LNA-enhanced PCR primer를 이용한 최상의 microRNA real time PCR profiling

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR

- 우수한 감도: 1 pg의 소량 total RNA부터도 각 microRNA의 재현성 높은 정량
- 96 well, 384 well PCR panel을 이용한 수백개의 microRNA profiling
- 최상의 특이성: LNA-enhanced primer를 이용한 특이성 높은 microRNA 검출
- 3시간의 빠르고 용이한 프로토콜

MicroRNA profiling을 위한 Exiqon의 독자적인 시스템

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR System(그림 9)은 아래의 두 가지 중요한 특징과 우수한 성능 및 사용의 편리성을 제공한다.

- Universal RT: 합성된 first-strand cDNA는 multiple microRNA PCR assay의 주형이 된다. 이 반응은 sample의 소모량과 조작에 의한 오차 값을 줄일 뿐만 아니라 시간과 노력을 절약할 수 있다.
- LNA PCR amplification: PCR 증폭 primer(forward와 reverse)는 각 microRNA에 특이적이고, LNA로 최적화되어 있다. LNA의 높은 민감성은 낮은 백그라운드로 microRNA family member를 검출할 수 있다.

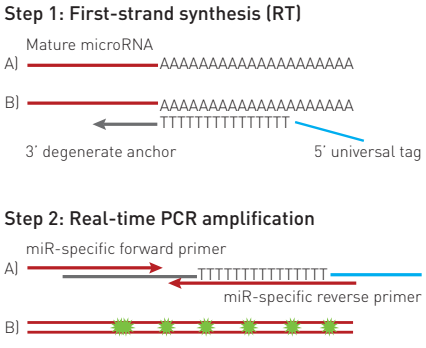


그림 9. Schematic outline of the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR System. A polyA tail is added to the mature microRNA template (step 1A). cDNA is synthesized using a PolyT primer with a 3' degenerate anchor and a 5' universal tag (step 1B). The cDNA template is then amplified using microRNA-specific and LNA-enhanced forward and reverse primers (step 2A). SYBR Green is used for detection (step 2B).

Exiqon의 개별 microRNA 정량과 expression profiling을 위한 방법은 그림 10과 같다. Exiqon의 제품은 유연하고 쉬운 방법으로 microRNA profiling이 가능하도록 최적화되어 있다. 일단 cDNA synthesis kit로 first strand cDNA를 합성 후 Ready-to-Use PCR panel(miRNome panels, Focus panels, custom designed Pick-&-Mix plate)(그림 11), 또는 미리 디자인된 각각의 PCR primer set, custom primer set를 이용하여 PCR을 수행할 수 있다.

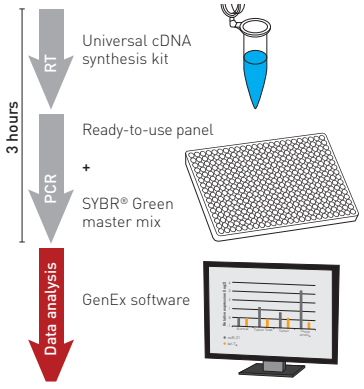


그림 11. Overview of the miRCURY LNA Universal RT PCR workflow. The PCR primer sets have been designed for optimal performance when used with Exiqon's ExiLENT SYBR Green master mix. Use of other master mixes may affect the quality of the results. Ready-to-use (miRNome, Focus and Pick-&-Mix) panels can be replaced by individual PCR primers in this workflow.

1 pg total RNA로부터 정확한 microRNA 정량 가능

LNA-enhanced Tm-normalized primer는 상당히 높은 민감성을 가지고 있으므로 1 pg 수준의 소량 total RNA로부터 재현성 높은 microRNA 정량이 가능하다(그림 12). 또한 단 20 ng total RNA를 이용하여 384well plate에서 다수의 microRNA profiling 실험을 수행할 수 있다. 이러한 Exiqon 제품의 특징은 FFPE section, LCM, serum/plasma나 그 외 biofluids와 같은 미량의 total RNA를 포함한 sample로부터 microRNA의 발현양상을 파악하는 데 중요하다(그림 13, 14).

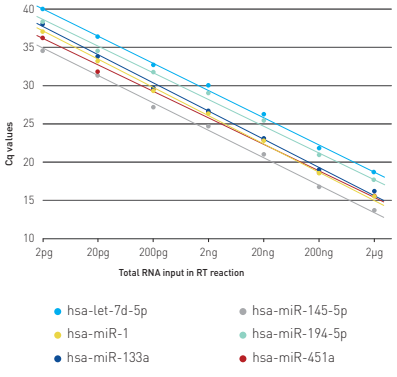


그림 12. Accurate quantitation from 1pg total RNA starting material. Data from the amplification of 6 microRNAs in serial dilutions of human AM6000 total reference RNA are shown. All microRNA assays exhibit linear read-out with correlation coefficients R(2) > 0,99.

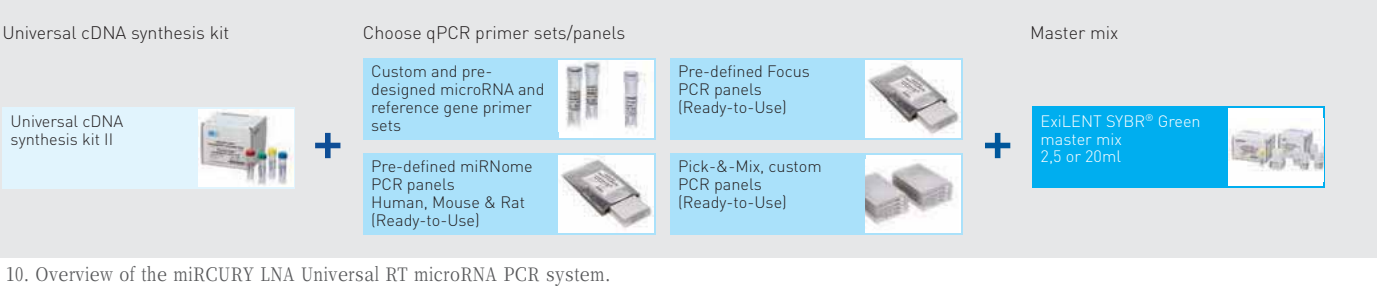


그림 10. Overview of the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR system.

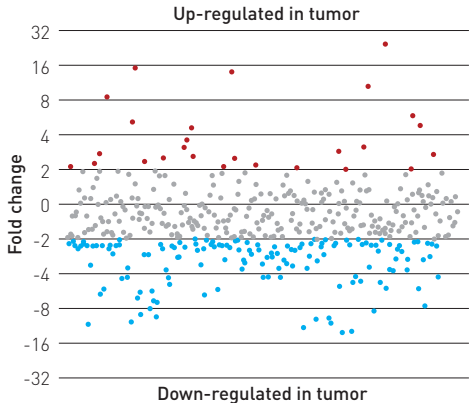


그림 13. Expression profiling of 742 microRNAs using 40 ng total RNA from tumor and normal FFPE sections. Real-time PCR was performed using triplicate RT reactions per sample on human miRNome microRNA panels Ⅰ and Ⅱ. Data from 424 microRNAs with Cp values <37 is included. Normalized expression is shown as fold changes in tumor compared to normal. Out of 424 microRNAs expressed, 144 were > 2-fold down-regulated in the tumor (blue dots) and 26 were > 2-fold up-regulated in the tumor (red dots).

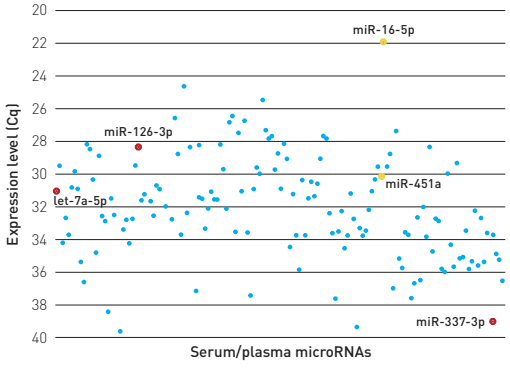


그림 14. microRNA profiling in blood serum and plasma. Serum/Plasma Focus microRNA PCR Panels were used to profile 175 microRNAs commonly found in serum/plasma. MicroRNAs for sample quality control in orange and interesting microRNAs in red.

Universal RT 반응을 이용한 소량의 샘플 사용

Exiqon의 qPCR system은 microRNA PCR 증폭 분석을 위해 first-strand cDNA pool을 형성하는 single universal RT 반응을 이용한다. 이 때문에 시료 사용을 절약할 수 있으며 실험 간의 오차를 줄이는데 용이하다. 합성된 cDNA는 보관하여 추가적인 PCR 반응에 사용 가능하므로 microRNA specific RT 반응보다 유연하게 실험을 진행할 수 있다.

높은 특이성

PCR amplification primer(forward, reverse)에 포함된 LNA는 microRNA family member간의 1염기 수준의 차이도 구별할 수 있도록 설계되었다(표 3). 또한 mature microRNA와 precursor microRNA도 구별 가능하다. 모든 miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR primer set는 ExiLENT SYBR Green master mix에 최적화되어 있으며 최소의 background signal로 정확한 target amplification이 가능하도록 validation되어 있다.

		Template			
Assay	Sequence	miR-181a	miR-181c	miR-181b	miR-181d
miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%
miR-181c-5p	AACAUUCAAC-CUGUCGGUGAGU	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	0.1%	100.0%	0.0%	0.0%
miR-181d	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU	0.0%	0.2%	0.0%	100.0%

표 3. Excellent discrimination between closely related microRNA family members. Examples of single nucleotide discrimination in the miR-181 family.

Real Time PCR을 이용한 biomarker 발굴

Exiqon의 real time PCR system은 biomarker 발굴에 이상적인 실험 방법이다. miRNome panel은 목적 시료에서 어떤 microRNA가 발현되는지를 확인 가능하며, Focus panel, Pick-&-Mix panel은 특정한 목적으로 시료에 특정 microRNA의 스크리닝하는 방법으로 비용을 절감할 수 있다(그림 15).

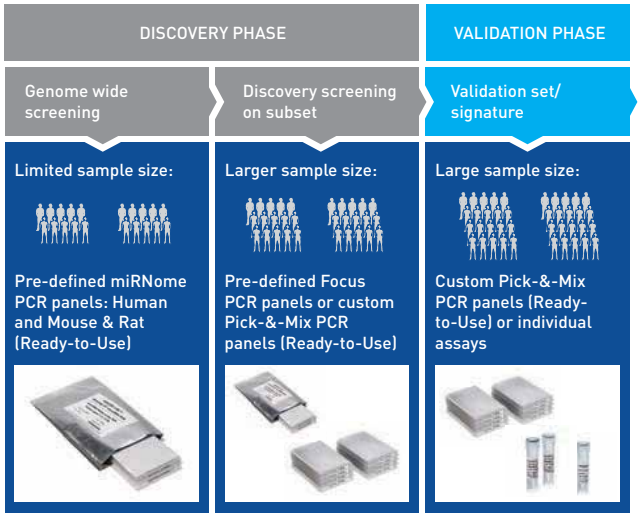


그림 15. Biomarker discovery workflow. Exiqon's qPCR system is designed for biomarker discovery, from screening in miRNome panels to final validation in a subset of samples by either Pick-&-Mix panels or individual assays.

Ready-to-Use PCR panels

모든 panel은 well당 10 ul reaction volume의 ready-to-use 형태로 되어 있어 cDNA와 ExiLENT SYBR Green master mix만 넣고 PCR 반응을 시작하여 약 3시간 만에 반응을 완료할 수 있다. Exiqon의 panel은 대부분의 Real time PCR 기기에 적용할 수 있는 reference gene과 control을 포함한다.

1) miRNome panels

miRNome panel에는 384well plate에 human, mouse, rat microRNA에 관한 primer가 분주되어 있다. Pre-amplification 과정 없이, 40 ng의 total RNA로부터 microRNA profiling이 가능하다.

- 752개의 human, 752개의 rodent microRNA assay 가능
- 많은 종류의 microRNA를 포함하는 assay에 적합
- Reference gene, inter-plate calibrator와 control primer set가 포함

2) Focus panels

Focus panel은 특정한 연구 분야에 대해 적용 가능한 real time PCR panel이며 Exiqon의 수천 개의 임상 샘플로부터 수집된 데이터를 이용하여 제작되었다.

- Serum/Plamsa Focus panel: 단 20 ul의 serum/plasma 샘플로부터 정확하고 민감한 microRNA profiling이 가능하다.
- Cancer Focus panel: oncogene, tumor suppressor 관련 microRNA profiling
- Stem cell Focus panel: 배아줄기세포와 만능줄기세포에 관련된 microRNA profiling
- Toxicoloy Focus panel: toxicology에 관련된 human, rat, dog, monkey microRNA profiling
- RNA QC panel: RNA sample의 quality control을 위한 PCR 분석법

3) Pick-&-Mix panels

Exiqon 홈페이지에서 연구자의 실험에 맞는 primer set의 선택과 plate layout을 디자인할 수 있다. 이 panel은 다수의 샘플로부터 microRNA를 검출하는데 적절하다.

- Fully customizable: plate 형태, layout, PCR 장치, 크기 등을 연구자가 원하는 대로 디자인할 수 있다.
- miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR assay에 최적화된 pre-designed primer set의 선택
- 연구자의 needs에 따라 pre-designed panel을 제작 가능
- 96 well 및 384 well 형태 모두 선택 가능

4) Individual pre-designed assay

Human, rat, mouse microRNA 뿐만 아니라 viral microRNA까지 포함한 방대한 qPCR primer set와 endogenous reference gene을 보유하고 있다. LNA가 포함된 1400개의 validated primer set를 선택 가능하며 단 1 pg의 total RNA로부터 microRNA의 정량이 가능하다.

5) Individual custom assays

Exiqon의 easy-to-use design tool을 이용하여 실험자의 목적에 맞는 microRNA 또는 small RNA primer set를 제작 가능하다.

- 모든 microRNA에 대한 LNA-enhanced qPCR primer set 제작 가능
- In-house 알고리즘에 의한 최적의 PCR primer set 제작

6) RNA quality control

RNA spike-in Kit 또는 ready-to-use 형태의 RNA QC panel을 이용하면 RNA sample의 quality control을 수행할 수 있다. RNA spike-in에 대한 control primer set 또한 PCR panel 또는 individual assay로 사용 가능하며, 이는 RNA 회수 수율, cDNA 합성 및 PCR 효율의 quality control에 사용된다.

4. Localization

microRNA와 small RNA 검출을 위한 LNA-enhanced Detection system

miRCURY LNA microRNA Detection Probes for *in situ* hybridization & Northern Blotting

- 다양한 label 형태의 LNA-enhanced probe를 선택 가능
- 최상의 특이성과 민감성
- 짧은 시간 내에 실험 완료
- 2.5 ug의 total RNA로부터 microRNA detection 가능
- Unlabeled 또는 custom label이 가능
- 방사성, 비방사성 방법 모두 가능

In situ hybridization과 Northern blotting을 위한 Exiqon 제품은 아래와 같다.

- Pre-designed miRCURY LNA microRNA Detection Probes: miRBase에 등록된 대부분의 microRNA에 이용 가능하다.
- Custom miRCURY LNA microRNA Detection Probes: microRNA, small RNA 뿐만 아니라 precursor microRNA도 이용 가능하다. 또한, positive control과 negative control probe도 구비되어 있다.

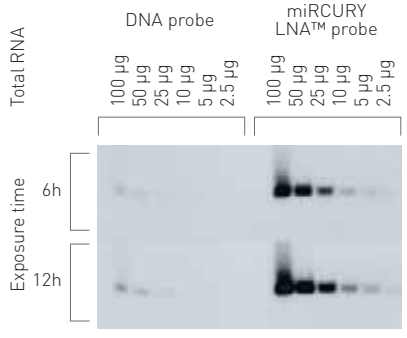


그림 16. LNA probes are superior to DNA probes. A. thaliana total RNA was hybridized with 32P-labeled DNA and LNA probes for miR-171. From Valoczi et al. 2004, Nucleic Acids Res. e175; reprinted with permission from Oxford University Press.

민감한 microRNA 검출

In situ hybridization을 위한 miRCURY LNA microRNA Detection Probe는 whole mounts, single cell 또는 FFPE(Frozen or Formalin-fixed paraffin-embedded) 조직에서 타겟과 높은 결합력으로 결합한다. FFPE sample에 대해서는 miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit과 함께 사용하는 것을 권장한다. miRCURY LNA microRNA Detection probe for *in situ* hybridization은 그림 17, 18과 같이 다양한 샘플에서 최상의 특이성을 보였다. Exiqon의 detection probe는 microRNA가 '어디에' 또는 '언제' 발현되는지 분석할 수 있는 최적의 툴이다.

그림 17. MicroRNA detection in zebrafish. Detection of miR-122a (top), miR-206 (middle) and miR-124a (bottom) using LNA probes in whole mount zebrafish embryos. Image kindly provided by Dr. Ronald Plasterk, Hubrecht Laboratory, The Netherlands.

그림 18. MicroRNA detection in chick. Specific detection of miR-206 in a Gallus gallus embryo using an LNA probe. miR-206 is detected in myotomal muscle cells (Ason et al. 2006).

높은 감도를 위한 double DIG labels

Double [5' and 3'] DIG-labeled probe는 single labeled probe에 비해 높은 감도로 microRNA 검출이 가능하다. 두 개의 DIG label의 협력효과는 noise를 낮추고 signal 강도를 높이는 결과를 나타낸다(그림 19).

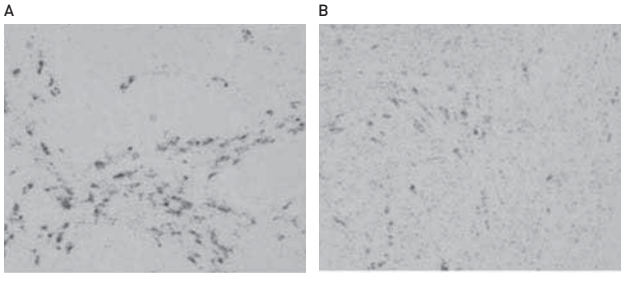


그림 19. Double DIG labeling is more sensitive than single DIG labeling. hsa-miR-21 detection in tissue sections using an LNA probe with a double DIG (5' and 3') label at 40nM (A) or a single 3' DIG label at 80nM (B).

FFPE 샘플의 *in situ* hybridization 반응조건 최적화를 위한 miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit(FFPE)

- 성공적인 microRNA ISH를 위한 지름길-적은 실험 단계와 최소화된 최적화 과정
- 빠르고 쉬운 one-day microRNA ISH protocol
- 최상의 특이성과 민감성: ISH 실험의 반응조건 최적화를 위한 필수 시약과 Double-DIG labeled LNA Probe 포함
- 다양한 조직에 사용가능: 실험용, 임상 FFPE 샘플에도 적용 가능

MicroRNA ISH 실험 시작을 위한 가장 쉬운 방법

miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit(FFPE)는 FFPE 조직 샘플에서 microRNA *in situ* hybridization(ISH) 실험의 조건을 최적화 및 셋팅하는데 효과적이다. 최상의 민감성을 가진 double [5' and 3'] DIG-labeled miRCURY LNA microRNA detection probe를 기반으로 한 본 제품은 성공적인 microRNA ISH 실험을 수행하는데 최적이다. 모든 kit에는 FFPE 조직 절편에 대한 LNA probe와 무독성의 formamide-free ISH buffer가 포함되어 있다.

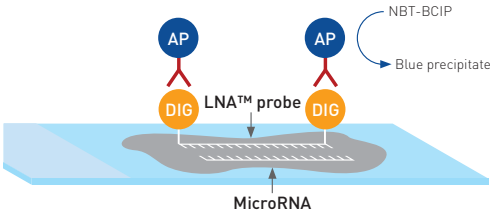


그림 20. Overview of the procedure. First, the tissue is "opened" using Proteinase K. In the hybridization step, the double DIG-labeled LNA probe binds specifically to its target microRNA. Alkaline phosphatase (AP)-conjugated anti-DIG antibodies are then added. This step is followed by NBT-BCIP development and optional counter-staining with Nuclear Red.

본 제품은 세포나 세포내 microRNA의 위치 연구와 microRNA의 발현 공간을 확인하는 실험 등에 적용할 수 있으며, 일반적인 ISH 프로토콜의 일부 과정(pre-hybridization, post-fixation, acetylation)을 제거한 빠르고 쉬운 프로토콜을 포함한다. 또한 formamide-free이고 방사성물질을 이용하지 않기 때문에 해로운 화학물질에 대한 노출을 최소화할 수 있다.

모든 샘플에 대한 솔루션

9종류의 miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit가 판매되고 있으며, 각 kit는 positive, negative control과 hybridization buffer, Proteinase K를 포함하고 있고 각 kit는 조직 특이적인 miRCURY LNA microRNA Detection probe를 포함한다(표 3). 이 probe는 다양한 조직과 세포 종류에 검증되어 있으며 실험의 초기 셋업과 최적화 과정에서 positive control probe로 사용된다.

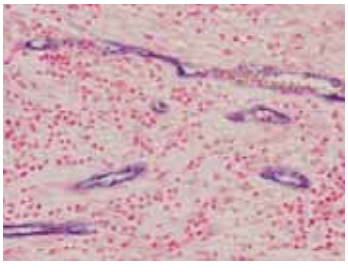


그림 21. miR-126 detection in colon wall. Kit 5 can be used to detect microRNAs in inflamed colon FFPE tissue. Here, it was used to detect miR-126. Staining was performed with NBT-BCIP (blue). Sections were counterstained with nuclear red.

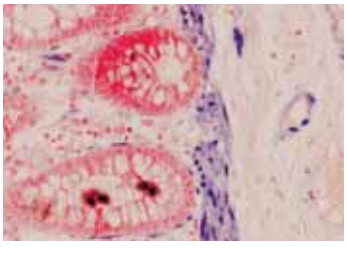


그림 22. miR-145 detection in human colon. Kit 7 can be used to detect microRNAs in colon FFPE tissue. Here, miR-145 is detected in a human colon wall with underlying muscle layers. Staining was performed with NBT-BCIP (blue). Sections were counterstained with nuclear red.

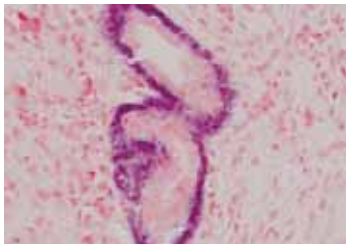


그림 23. miR-205 detection in human breast carcinoma. Kit 8 can be used for detection of microRNAs in breast cancer FFPE tissue. Here, it was used to detect miR-205. Staining was performed with NBT-BCIP (blue). Sections were counterstained with nuclear red.

miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit의 선택

아래 표 4는 각 kit에 적용 가능한 조직과 세포 종류를 나타낸다.

	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4	Kit 5	Kit 7	Kit 8	Kit 9
Brain				yes				
Eye				yes	yes			
Muscle	yes				yes			
Lung					yes	yes		
Kidney					yes			
Liver			yes		yes			
Colon					yes	yes		yes
Cervix							yes	
Heart	yes				yes	yes		
Mammary Gland					yes		yes	
Lung cancer		yes			yes	yes	yes	
Colorectal cancer		yes			yes	yes		
Breast cancer		yes			yes	yes	yes	
Kidney cancer		yes			yes	yes		
Cervix cancer		yes			yes	yes	yes	
Testis cancer					yes	yes		
Esophagus cancer								yes
Cell entity	myocyte	varies	hepatocyte	neuron	endothelial	smooth muscle	basal cells	granulocyte

표 4. Choosing the appropriate miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit. The table indicates the tissue(s) in which each of the kits has been validated.

5. Functional Analysis

MicroRNA의 기능 연구를 위한 강력한 방법

miRCURY LNA microRNA Inhibitors & Power Inhibitors

- AU-rich microRNA target에도 높은 효율
- miRBase 등재 microRNA 뿐만 아니라 Exiqon의 miRPlus microRNA에 대한 inhibitor도 가능
- Off-target effect의 최소화로 낮은 농도에서도 최상의 억제효율
- 높은 특이성과 안정성으로 지속적인 antisense 활성
- 폭넓은 적용성 - *in vivo*와 family inhibitor

강력한 microRNA inhibitors

Exiqon의 miRCURY LNA inhibitor는 microRNA 활성을 억제하는 저해제로써 microRNA의 확인과 검증을 위해 사용하거나, 세포의 프로세스나 질병의 경로에서 microRNA의 역할을 연구하기 위해 사용된다. 최적의 길이와 LNA의 위치를 조절하는 디자인 알고리즘을 이용하여 모든 microRNA inhibitor가 제작된다. 이 inhibitor는 자가결합self-complementarity이 최소화되며 생물학적 안정성을 유지하는 한편 타겟에 대해 높은 억제율을 나타낸다. 또한 LNA 염기는 전체 inhibitor에 분산되어 삽입되는데, 이는 LNA inihibitor/RNA duplex가 RNaseH의 기질로써 인식되지 못하게 함으로써 off-target effect를 최소화하도록 한다.

1) miRCURY LNA microRNA Inhibitors는 디자인 알고리즘을 이용해 미리 디자인된 inhibitor로 Tm-normalized되어있으며 최상의 억제율과 안정성을 가질 수 있도록 최적화되어 있다(그림 24). Exiqon은 inhibitor libraries도 제공하며, miRCURY LNA Inhibitor Libraries는 세 가지로 분류된다.

- Human library: 980 microRNA
- Mouse library: 739 microRNA
- Combined human and mouse library: 980 Human + 739 mouse microRNA

모든 library는 0.2 nmol의 건조 된 형태로 96-well plate에 제공된다.

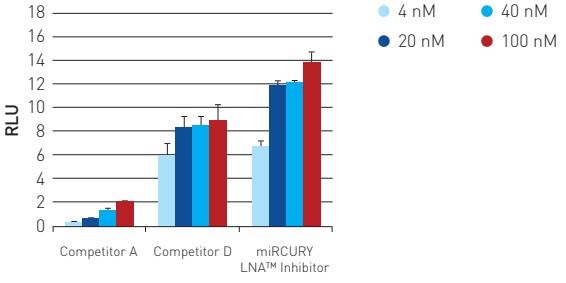


그림 24. Exiqon's microRNA inhibitors offer higher efficacy than leading competitors. MCF7 cells were cotransfected with a Firefly Luciferase-Reporter plasmid with a miR-21 target sequence, a transfection efficiency control and different concentrations of miR-21 inhibitors. Reporter gene expression was measured 48h after transfection with a Dual Luciferase assay.

2) miRCURY LNA microRNA Power Inhibitors는 타겟에 대해 최고의 억제율을 자랑한다. 이 inhibitor는 phosphorothioate(PS) backbone을 갖추고 있어 효소 분해에 대해 강한 내성을 지녀, 최상의 억제율과 장시간 안정성을 보인다(그림 25).

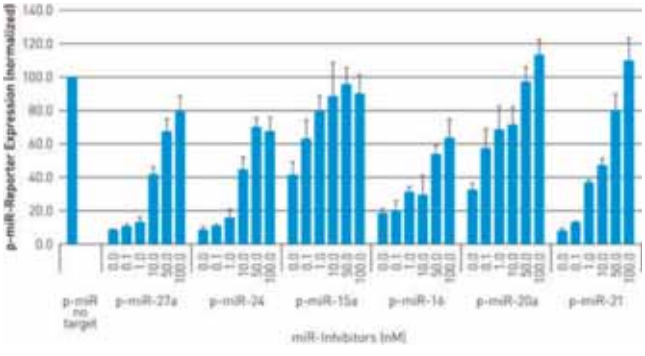


그림 25. Silencing of common microRNAs. HeLa cells were transfected with a Firefly Luciferase-Reporter plasmid with a miR target sequence, a plasmid expressing Renilla luciferase (transfection efficiency control) and the corresponding miRCURY LNA microRNA Inhibitor in different concentrations. Reporter gene expression was measured 48 h after transfection with a Dual Luciferase assay. Ratios of Firefly and Renilla luciferase activity were calculated and normalized to values obtained with a Firefly Luciferase reporter with no miR target sequence (p-miR no target).

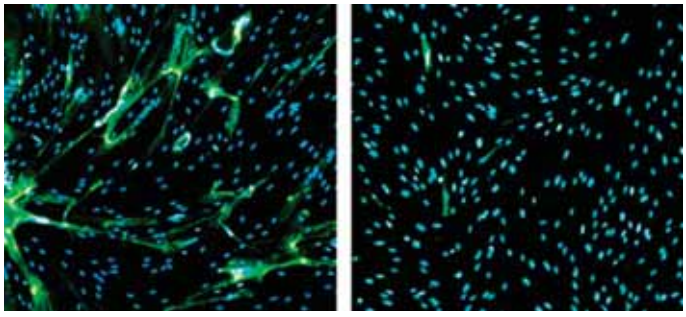


그림 26. Efficacy of microRNA Power Inhibitors. Cells transfected with miRCURY LNA microRNA Power Inhibitor against miR-181a (right panel) fail to differentiate normally (left panel). LHCN-M2 cells were plated and transfected with 50 nM of microRNA inhibitor or control. After 24 hours differentiation was induced by shifting to low serum medium. Seven days later the cells were fixed in formalin and permabilized with Triton.Cells were stained with late differentiation marker (Myosin Heavy Chain (MHC)-Alexa488) and nuclei with Hoechst 33258. No MHC (green) is observed in miR-181a transfected cells. In addition, pictures without stains show that they also fail to form myotubes. Mir-181a is required to down-regulate HoxA11 which in turn is a repressor of MyoD. The absence of mir-181 causes a repression of MyoD, resulting in a failure of the cells to differentiate.

3) miRCURY LNA microRNA Family Inhibitors는 microRNA family 내 모든 microRNA를 일시적으로 억제할 수 있다. Family inhibitor는 human과 mouse에 보존된 40개 종의 microRNA family에 이용 가능하며 PS backbone을 보유한 Power Family inhibitor도 보유하고 있다.

4) *In vivo* miRCURY LNA microRNA inhibitors는 살아있는 동물 실험에 적용 가능한 microRNA inhibitor로 custom 제작이 가능하다.

모든 microRNA inhibitor는 fluorescein[6-FAM]과 Ready-to-label (unlabeled) 형태의 라벨링이 가능하며 HPLC 정제가 완료된 5 nmol의 dried-down oligonucleotide이다. *In vivo* inhibitor의 경우 실험 동물에 적합하도록 정제가 되며 대용량 제품도 가능하다.

5) miRCURY LNA microRNA Target Site Blockers는 microRNA와 특정 타겟 간의 상호작용을 억제할 수 있는 antisense oligonucleotides이다. MicroRNA는 일반적으로 다수 타겟의 발현을 조절하기 때문에 microRNA inhibitor는 다수의 타겟에 대해 작용하게 된다. 그러므로 microRNA 억제에 따른 표현형은 여러 타겟을 억제한 결과이다. 이러한 다수의 타겟을 동정하는 것은 microRNA의 기능을 이해하는데 중요하다. Target Site Blocker(TSB)는 단일 타겟에 대해 특이적으로 저해함으로써 표현형의 해석이 가능하다. 그림 27과 그림 28에서 Target Site Blocker의 기작을 확인할 수 있다.

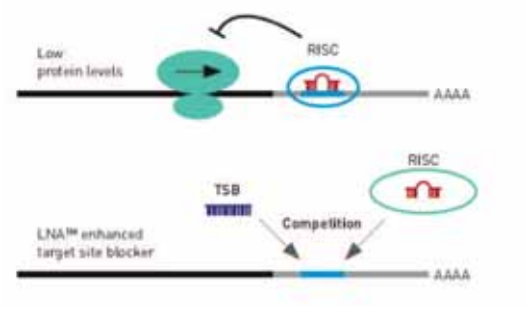


그림 27. LNA enhanced Target Site Blockers compete effectively with RISC for microRNA binding site. Target Site Blockers are antisense oligonucleotides designed to compete with microRNA/RISC by hybridizing to the microRNA target site of a particular mRNA.

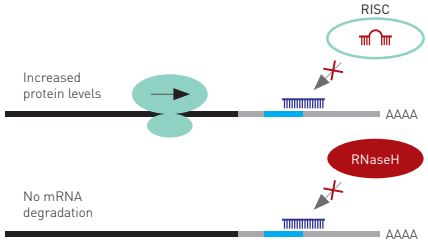


그림 28. Target Site Blockers stimulate translation of specific mRNAs by masking the microRNA target sites. LNA enhanced high affinity target site blockers compete effectively with microRNA/RISC for the microRNA target site. In addition LNA distribution throughout the LNA/DNA mixmer ensures that the antisense oligonucleotide does not catalyze RNaseH dependent degradation of the mRNA. As a result the TSB will cause increased expression of the protein encoded by the targeted mRNA.

[License Notice www.Exiqon.com 참조]

소량의 분해된 RNA를 이용한 cDNA library 제작

SMARTer® Universal Low Input RNA Kit for Sequencing

- 분해된 RNA(RIN 2-3), non-polyadenylated RNA를 이용하여 cDNA library 제작
- 소량의 시료 – 200 pg rRNA-depleted RNA(2 ng total RNA)
- FFPE나 LCM과 같은 어려운 샘플에 이상적
- 5’ 또는 3’ 편향이 없는 complete transcriptome coverage
- 뛰어난 재현성, mappability, ERCC correlation

서론

차세대 시퀀싱(Next Generation Sequencing, NGS)은 전체 transcriptome에서 높은 감도와 다양한 범위로 RNA 발현 분석을 가능하게 했다. 하지만 FFPE(formaldehyde fixed paraffin embedded tissue)나 LCM(laser captured microdissection)과 같이 RNA 샘플이 분해되어 품질이 좋지 않거나 소량인 샘플에서는 적용하기 어려운 한계가 있다.

SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing을 이용하면 분해되거나 소량의 샘플에서도 random primer를 이용하여 cDNA library를 제작할 수 있고, 이때 이용되는 샘플 양은 불과 2 ng total RNA이다. 이 키트의 산물은 5’ 또는 3’으로 편향되지 않은 whole transcriptome coverage를 보이며, 뛰어난 재현성reproducibility, mappability, ERCC correlation을 보인다. 또한 transcriptome profiling용 cDNA library 제작은 2일 밖에 소요되지 않는다(그림 1). 또한 본 키트를 이용하여 RIN(RNA Integrity number) value가 2.4인 human brain total RNA 샘플로 cDNA library를 제작하는 실험도 진행되었다.

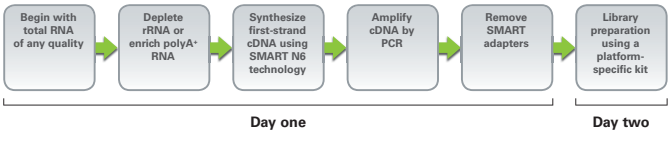


그림 1. NGS Work flow for the SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing

SMART cDNA 합성 프로토콜

Clontech의 SMART(Switching Mechanism At the 5' end of the RNA Template) 기술은 단일 반응으로 full-length cDNA를 합성할 수 있는 획기적인 방법이다. 이 방법은 역전사효소의 말단전이효소terminal transferase 활성과 주형전환template switching 활성을 이용하여 1st strand cDNA의 3’ 말단에 PCR adaptor를 부가하므로 별도의 ligation 단계가 필요 없다.

잘 보존된 mRNA 샘플의 경우에는 역전사 단계에서 oligo dT primer를 이용하고 single cell 레벨에도 적용 가능한 SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Illumina Sequencing-HV를 추천한다. 반면, 분해된 소량의 RNA(200 pg- 10 ng)를 이용하여 cDNA를 합성하는 실험에는 random primer(modified N6 primer)를 이용하는 SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing을 추천한다(그림 2).

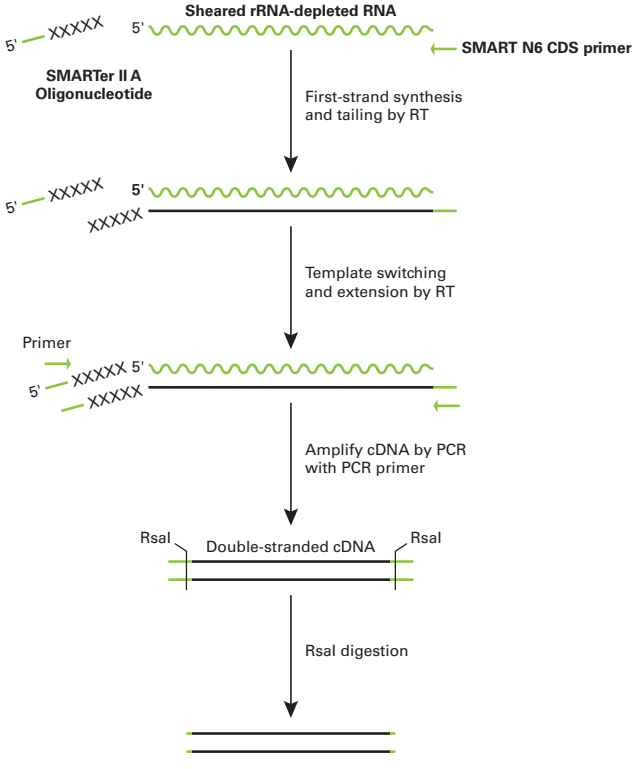


그림 2. Synthesis scheme for SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing. First-strand cDNA is synthesized from sheared rRNA depleted RNA, using a modified N6 primer called SMART N6 CDS (N = A, G, T, or C). When SMARTScribe Reverse Transcriptase reaches the 5' end of the RNA, its terminal transferase activity adds a few additional nucleotides to the 3' end of the cDNA. This non-template nucleotide stretch anneals with the SMARTer Oligonucleotide, creating an extended template where the RT continues through the II A sequence. The SMARTer anchor sequence and the modified N6 sequence serve as universal priming sites for cDNA amplification. Finally, amplified cDNA is digested with RsaI to remove the adapter prior to sequencing.

분해된 소량의 human brain total RNA을 이용하여 cDNA library 제작

Human Brain Total RNA(Code 636530)를 화학적으로 절단[1]한 후 SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing을 이용하여 cDNA library를 제작하였다. 300 ng의 절단된 human brain RNA에 화학적으로 절단한 ERCC(External RNA Controls Consortium) control RNA를 섞었다. 그 후, 100 ng의 샘플을 Epicentre Ribo-Zero(Illumina, Cat. No. MRZH116)의 변형 프로토콜을 이용하여 rRNA를 제거했다. 분해된 RNA는 electropherogram에서 200 bp 근처에서 넓은 peak를 나타내었다(그림 3, panel A).

Note: Epicentre Ribo-Zero의 변형 프로토콜은 Clontech(www.clontech.com)에서 *"Protocol for Removal of rRNA from Small Amounts of Total RNA"*로 검색하면 자세한 내용을 확인할 수 있다.

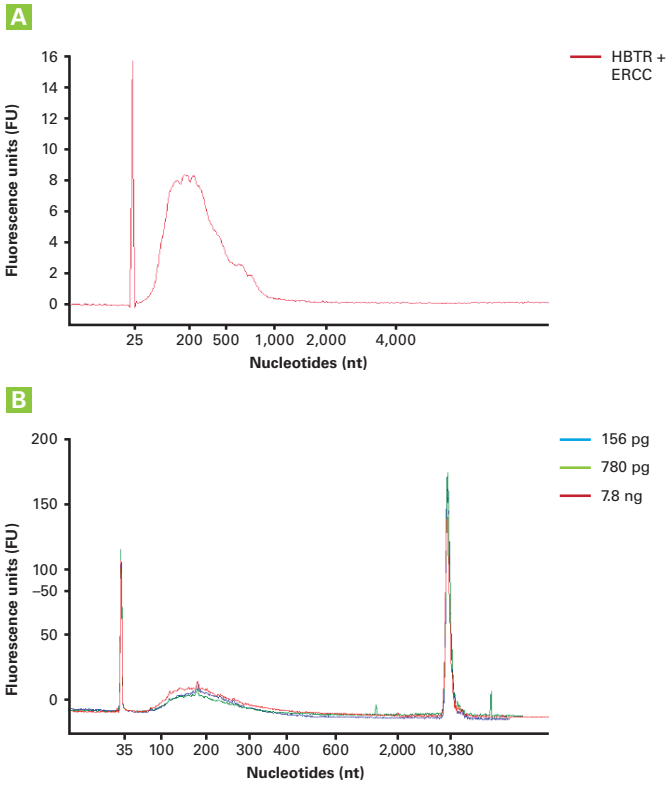


그림 3. Yield and purity of input RNA and resulting cDNA libraries. Panel A. Human Brain Total RNA (HBTR) was chemically sheared, spiked with ERCC control RNA (4 µl of a 1:1,000 dilution per 100 ng), and rRNA-depleted using a modified Ribo-Zero protocol for lowinput samples. One microliter was analyzed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (RNA 6000 Pico chip). Panel B. Three amounts of rRNAdepleted RNA (156 pg, 780 pg, and 7.8 ng) were used as input for the SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing, and 1 µl of the resulting cDNA library was analyzed on the Agilent 2100 Bioanalyzer (High Sensitivity DNA chip).

위와 같이 rRNA를 제거한 RNA를 cDNA 합성에 사용하였다(156 pg, 780 pg, 7.8 ng의 rRNA-cleared RNA는 각각 total RNA 2 ng, 10 ng, 100 ng에 해당하는 양이다). SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing을 이용하여 제작된 cDNA library는 사용한 RNA 농도에 상관없이 비슷한 수율과 순도를 나타냈다(그림 3. panel B). 각각의 cDNA library 1-2 ng으로 Clontech의 Low Input Library Prep Kit(Code 634947)을 이용하여 Illumina MiSeq 장비로 분석하기 위한 시퀀싱용 library를 준비하였다. 모든 library는 높은 수치로 read되었으며 84-87%의 mapped, unique mapped 77-79%이며, 15,000개 이상의 유전자를 식별했다. 3 종류의 library에서 rRNA는 2% 미만이었다 (표 1).

Table I: Sequence Alignment Metrics

Input RNA	156 pg	780 pg	7.8 ng
No. of Reads	27,043,029	25,247,363	16,991,089
Mapped to rRNA	316,377 (1.2%)	360,696 (1.4%)	324,628 (1.9%)
Mapped to Mitochondrial RNA	6,408,693 (24%)	6,007,327 (24%)	3,858,048 (23%)
Mapped to RefSeq	16,863,730 (84%)	16,158,298 (86%)	10,977,858 (87%)
Uniquely Mapped to RefSeq	15,480,061 (77%)	14,823,088 (79%)	10,034,740 (79%)
Exons	6,464,355 (38%)	6,185,920 (38%)	4,256,916 (39%)
Introns	10,399,375 (62%)	9,972,378 (62%)	6,720,942 (61%)
Genes Identified	15,140	15,574	15,697

표 1. Sequencing alignment metrics for three N6 libraries. cDNA libraries were created using 156 pg, 780 pg, and 7.8 ng of rRNA-depleted human brain reference RNA and used for sequencing. Illumina adapters and indices were added to 1–2 ng of each cDNA library using the Low Input Library Prep Kit, and the cDNA samples were sequenced on an Illumina MiSeq Platform with 1 x 50 bp reads. Reads were trimmed by CLC Genomics Workbench and mapped to rRNA and the mitochondrial genome with CLC (% reads indicated). The unmapped reads were subsequently mapped with CLC to the human genome with the RefSeq masking, producing mapped reads and uniquely mapped reads. The number of genes identified in each library was determined by the number of genes with an RPKM (read per kilobase of exon per million of reads) of at least 0.1. The number of reads that map to introns or exons is a percentage of the reads successfully mapped to RefSeq. Note: The 156 pg, 780 pg, and 7.8 ng of rRNAdepleted RNA correspond to 2 ng, 10 ng, and 100 ng of total RNA, prior to rRNA depletion.

SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing은 ~87%의 높은 mappability를 나타내며, 다양한 농도의 RNA 적용에서도 높은 재현성과 민감도를 나타낸다(그림 4). 156 pg-7.8 ng의 rRNA-depleted RNA로 각각 제작한 cDNA library에서 발현 정도에 대한 Pearson correlation data는 높은 재현성을 보여준다(그림 4, Panel A-C). 156 pg의 데이터에서 편차가 약간 증가하는 것은 소량의 RNA를 이용하였기 때문일 것이다. 각각 다른 농도의 RNA를 이용한 결과값을 correlation plot에서 비교했을 때 모든 데이터 세트에서 일관된 결과를 보였다(그림 4, Panel D-F)

이와 같은 결과는 SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing을 이용하면 156 pg만큼의 매우 적은 양의 rRNA-cleared RNA로도 고품질의 cDNA library를 제작할 수 있다는 것을 보여준다.

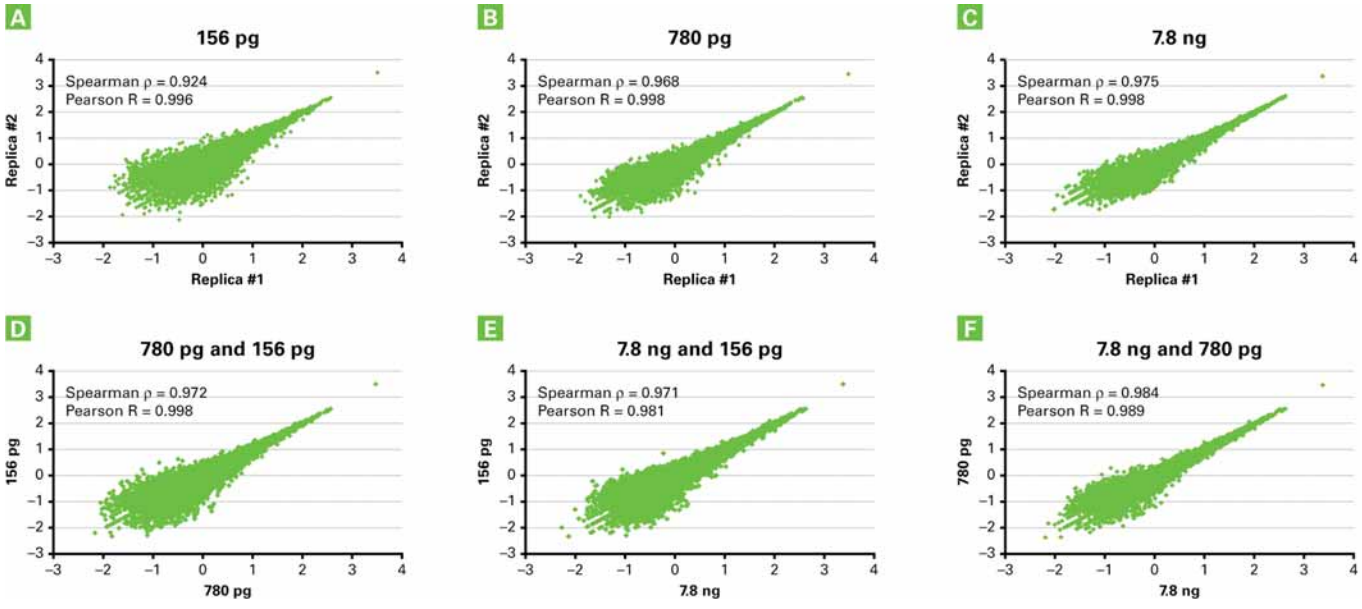


그림 4. High reproducibility and sensitivity across a wide RNA input range. Scatter plots of expression (RPKM, read per kilobase of exon per million of reads) for cDNA libraries prepared from rRNA-depleted human brain RNA. Panels A-C. Comparisons of pairs of cDNA library replicas (Replica #1 and Replica #2) created from 156 pg, 780 pg, and 7.8 ng of input RNA show high reproducibility across a wide range of RNA concentrations. Panels D-F. Comparisons of cDNA libraries generated from pairs of RNA input amounts (780 pg and 156 pg, 7.8 ng and 156 pg, and 7.8 ng and 780 pg) show a high correlation, suggesting consistency across input levels. Axes are plotted on a log10 scale. Insets indicate the coefficient of correlation by Spearman analysis (ρ) and by Pearson correlation (R).

ERCC[2] 분석에서는 >0.99 Pearson correlation을 나타냄으로써 duplicate library 사이의 높은 재현성을 확인할 수 있었다(그림 5). 또한 시퀀싱을 통해서 밝혀진 발현 레벨은 첨가된 control transcript의 레벨과 일치하는 결과를 보여주었다. 이는 0.84-0.97의 slope와 0.858-0.936의 R^2 값으로 보여진다. 예상대로 일반적으로 사용하는 RNA 양보다 훨씬 적은 양이 첨가된 control transcript는 나타나지 않았다.

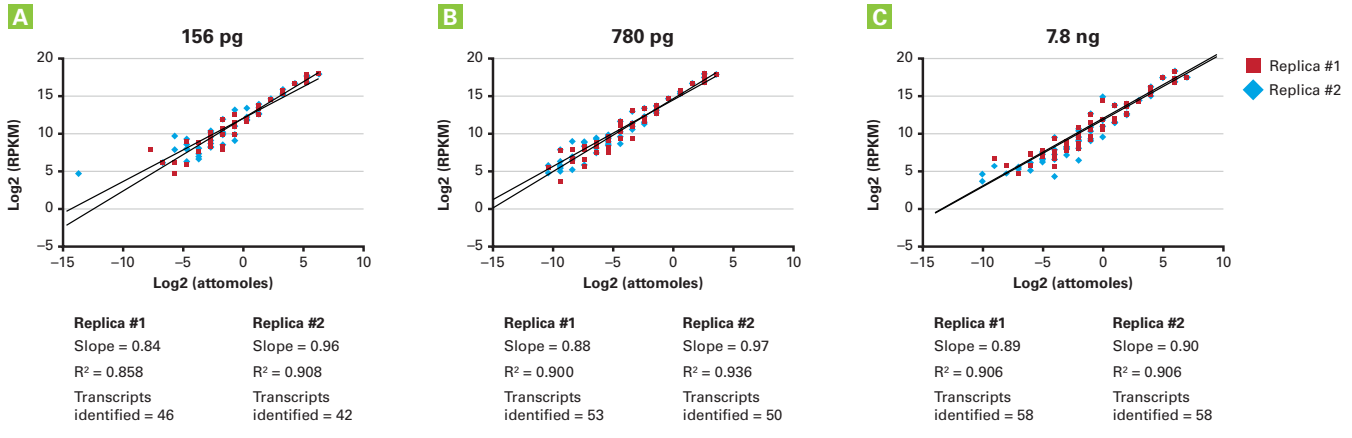


그림 5. High reproducibility confirmed by ERCC analysis. The ERCC (External RNA Control Consortium) Spike-In Mix (92 transcripts) was chemically sheared and 4 microliters (1:1,000 dilution) was spiked into 100 ng of chemically sheared human brain total RNA prior to rRNA depletion. Two cDNA library replicates were generated with each of 156 pg, 780 pg, and 7.8 ng of rRNA-depleted RNA/ERCC mix using the SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing. RPKM of the ERCC transcripts was plotted against the attomoles per transcript spiked in. The slope, R^2, and the number of transcripts are indicated per replicate. Pearson correlation (R) values per replica set were determined to be 0.998, 0.999, and 0.992 for Panels A-C, respectively. Axes are plotted on a log2 scale.

SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing는 소량의 total RNA로 실험을 시작하더라도 넓은 범위에서 균일한 transcript coverage를 제공한다. 156 pg, 780 pg, 또는 7.8 ng의 human brain total RNA를 이용하여 cDNA library를 제작한 뒤 유전자의 body coverage를 비교하기 위해서 데이터 plot을 겹쳤을 때, 모든 조건에서 5' 또는 3' 편향은 아주 적었다(그림 6).

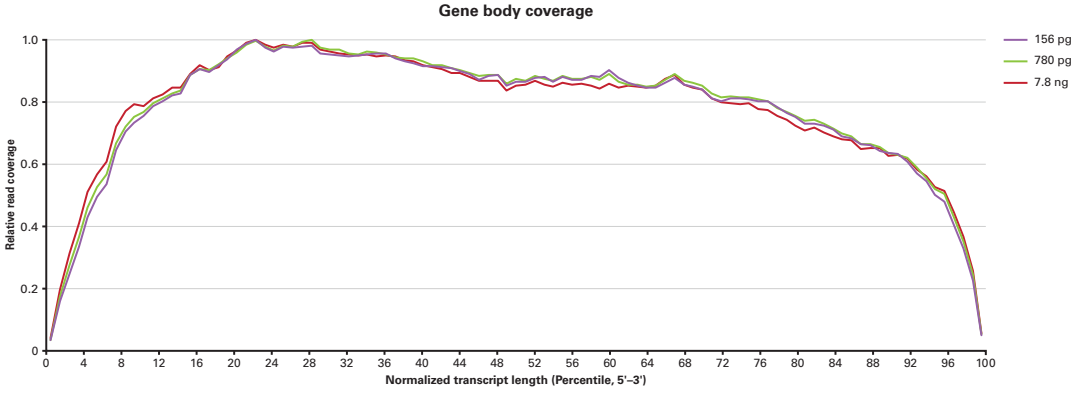


그림 6. Uniform gene body coverage. Overlaid data comparing transcript coverage from cDNA libraries generated using 156 pg, 780 pg, and 7.8 ng of rRNA-depleted human brain RNA. The x-axis represents gene length (RefSeq) normalized to 100%, where 0 is the 5'-end of each transcript and 100 is the 3'-end. The y-axis represents the read coverage relative to the highest coverage percentile.

매우 적은 양의 RNA를 SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing으로 합성한 cDNA는 훨씬 많은 양의 RNA를 필요로 하는 전통적인 방법(e.g. microarray)과 유사한 gene count를 나타낸다. SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing으로 얻어진 데이터와 MicroArray Quality Control(MAQC) project[3]을 이용하여 얻어진 qPCR 데이터는 높은 상관성을 보여준다(그림 7). 159 pg에서 5.3 ng의 RNA 범위를 이용하여 얻은 결과값이 높은 상관성(R 0.87–0.88)을 나타내며, 이는 본 키트를 사용하여 얻은 결과값이 매우 정확하다는 것을 보여준다고 할 수 있다.

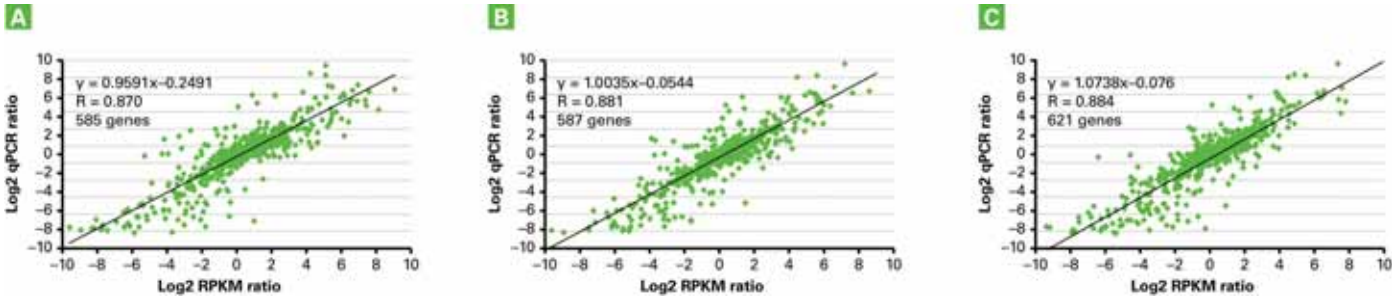


그림 7. High correlation with qPCR data via MAQC analysis. Scatter plots were used to compare differential expression data obtained by sequencing cDNA libraries created with the SMARTer Universal RNA Kit [106 pg HURR/159 pg HBRR (A), 530 pg HURR/790 pg HBRR (B), and 5.3 ng HURR/7.9 ng HBRR (C)] and quantitative PCR (qPCR) data available for HURR and HBRR through the MAQC (MicroArray Quality Control) project (2). The slope and correlation (R) for the comparison line of expression ratio (in RPKM) and qPCR ratio (in Ct) are plotted for HURR and HBRR, in a log2 scale. The number of genes present in both data sets is indicated. HURR = Human Universal Reference RNA. HBRR= Human Brain Reference RNA.

결론

SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing은 매우 적은 양의 분해된 total RNA(RIN value 2-3)나 poly A가 없는 mRNA를 이용하여 효과적으로 RNA-seq를 위한 library를 제작할 수 있다. 이 기술은 최소 200 pg의 rRNA-cleared RNA(2 ng total RNA)만으로도 RNA-Seq에 적용할 수 있으며, 따라서 FFPE나 LCM 분석에 이상적이다. SMARTer 기술은 유전자 coverage에서 최소의 편향을 나타내며, 기존의 방법보다 뛰어난 재현성, mappability, ERCC correlation을 보인다.

Reference

(1) Mortazavi, A. *et al.*(2010) *Nat. Methods* **5**(7):621–628.

(2) Jiang, L. *et al.* (2011) *Genome Res.* **21**(9):1543–1551.

(3) MAQC Consortium (2006) *Nat. Biotechnol.* **24**(98):1151–1161.

관련제품

Code	제품명	용량
634938	SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing	10 Rxns
634940		25 Rxns
634945	SMARTer Universal Low Input RNA Library Prep Kit	10 Rxns
634946		25 Rxns
634820	SMARTer Ultra Low Input RNA for Illumina Sequencing - HV	12 Rxns
634823		24 Rxns
634826		48 Rxns
634828		96 Rxns
634830		480 Rxns
634936	SMARTer Ultra Low RNA Kit for Illumina Sequencing	100 Rxns
634947	Low Input Library Prep Kit	12 Rxns
634832	SMARTer Ultra Low RNA Kit for the Fluidigm C1 System	2 IFCs
634833		10 IFCs

Lentivirus Systems & Tools

Lentivirus Systems

- 최대 ~10^8 IFU/㎖의 매우 높은 역가의 렌티바이러스 조제 가능
- 48 시간 이내에 VSV-G pseudotype의 lentivirus 획득
- 5 개의 vector로 분리된 packaging mix를 이용하여 바이러스 감염에 대한 안정성 확보

Clontech의 Lenti-X Expression System (Code 632164)은 광범위한 세포에 높은 역가로 적용할 수 있으며 발현효율을 높일 수 있도록 한 단계 더 발전된 렌티바이러스 시스템이다. RNA 바이러스 계열의 재조합 레트로 바이러스 중 하나인 렌티바이러스는 비분열 세포와 줄기세포, 뇌, 간, 근육과 같은 *in vivo* 조직 등 거의 모든 포유류 세포를 감염 및 형질전환하여 목적 단백질을 안정적으로 발현시킨다.

최적화된 Lenti-X Vector

Lenti-X vector는 렌티바이러스의 생산과 복제에 필요한 LTRs과 패키징 서열을 가지고 있을 뿐만 아니라 이식유전자$_{transgene}$의 발현과 역가를 향상시킬 수 있는 요소를 포함하고 있다. WPRE 서열은 293T cell에서의 바이러스 패키징을 향상시켜 역가를 증가시키고 성숙한 mRNA의 생산을 촉진함으로써 목적 세포에서의 cDNA transgene의 발현을 높인다. cPPT element는 바이러스 게놈을 핵안으로 삽입시키는 과정의 효율을 증가시켜 형질전환 효과를 향상시킨다. Lenti-X system은 항시발현하는 pCMV기반의 발현(Lenti-X Expression System)이지만 Tet-On/Off 발현의 유도발현 시스템(Lenti-X Tet-On/Tet-Off Expression System) 또는 형광단백질과 융합한 재조합 단백질 발현 시스템(AcGFP1 또는 DsRed-Monomer)과 같이 다양한 발현에 적용할 수 있다.

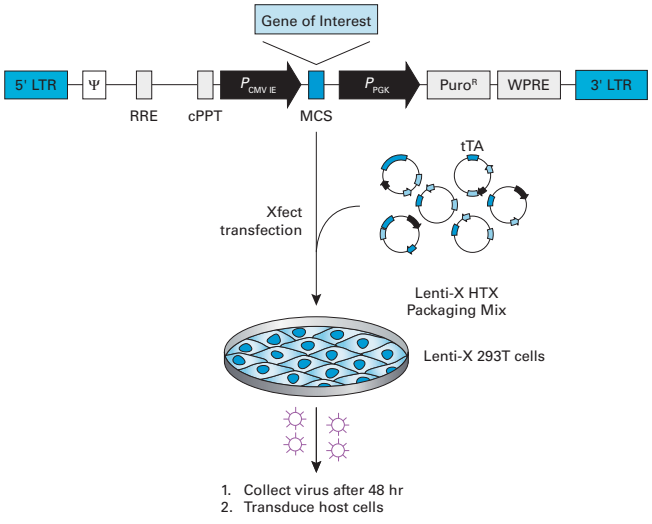


그림 1. 4th generation lentiviral packaging system. A lentiviral vector and the Lenti-X HTX Packaging Mix are cotransfected into 293T cells. High titer lentiviral supernatants are ready for use 48 hr after transfection.

최고의 성능을 갖는 패키징 시스템

시스템에 최적화된 구성 성분들 간의 시너지 효과에 의해 Lenti-X HTX Packaging System은 뛰어난 바이러스 생산 능력을 갖는다(그림 1).

첫째, Lenti-X HTX Packaging Mix는 렌티바이러스의 패키징에 필수적인 구성유전자가 최적의 비율로 포함되어 있어 바이러스를 고효율로 생산 가능하다. 또한 이 구성요소들이 각각의 vector로 분리되어 있어 바이러스의 자가 복제를 억제할 수 있으므로 실험자의 감염 가능성을 현저히 줄일 수 있다.
둘째, Tet-off 전사촉진에 의한 Tetracycline-responsive promoter elements(TREs) 조절로 렌티바이러스 패키징의 핵심 구성요소가 고발현되어 높은 역가의 바이러스를 획득 가능하다.
셋째, Clontech의 렌티바이러스 시스템에 최적화된 나노입자 기반의 트랜스펙션 시약인 Xfect는 효과적으로 유전자를 도입시켜 고효율의 렌티바이러스를 생산한다. Xfect를 Lenti-X 293T 세포에 적용 시, 최대 95% 이상의 트랜스펙션 효율을 확인하였다.

렌티바이러스 관련 모든 제품군 보유

Lenti-X system은 거의 모든 세포에 적용할 수 있으며 특히 형질 도입이 어려운 세포에 유전자를 도입하여 stable cell line이나 유도 발현 시스템을 구축할 때 매우 유용하다. 추가로 Lenti-X 시스템에 포함된 Lenti-X GoStix을 이용하면 30 초 ~ 10 분 이내에 렌티바이러스의 감염 역가가 충분한지, 아닌지 확인할 수 있으며 만약 역가가 충분하지 않다면 Lenti-X Concentrator를 이용하여 농축할 수 있다. 그 외 Clontech에서는 렌티바이러스를 정제하는 Lenti-X Maxi Purification Kit나 역가를 측정하기 위한 Lenti-X qRT-PCR Titration Kit, provirus의 역가를 측정하는 Lenti-X Provirus Quantitation Kit과 같은 제품을 통해 효과적으로 유전자 도입이 가능하게 지원하고 있다.

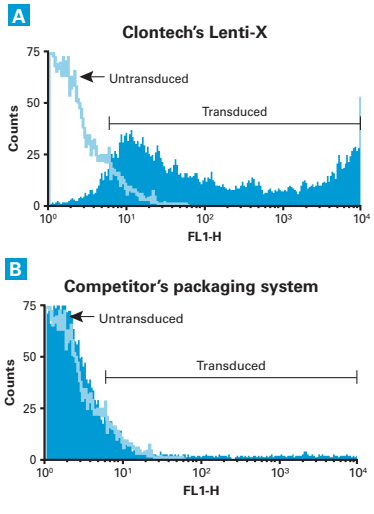


그림 2. High infectivity of supernatants produced by Lenti-X. Lenti-X (Panel A) and a packaging system from a competitor (Panel B) were each used to generate virus containing a vector system for expressing the ZsGreen1 fluorescent protein. 10 µl of supernatant from each system was used to transduce HeLa cells. ZsGreen1-positive cells were quantified by flow cytometry Lenti-X transduced the majority of cells, whereas the other system transduced only a small percentage of the cells.

Lentivirus Transduction Tools

렌티바이러스 농축 시약
Lenti-X™ Concentrator

- 짧고 간편한 프로토콜
- Ultracentrifugation 불필요
- 최대 100배 농축 가능, ~90% 회수율

단순한 프로토콜: mix, wait, spin

Lenti-X Concentrator를 이용하면 빠르고 쉽고 효과적으로 렌티바이러스 농축이 가능하다. 이 프로토콜은 렌티바이러스 상층액에 Lenti-X Concentrator reagent를 첨가하고, 30 분 (~overnight) incubation 후에 일반 centrifuge를 이용하면(그림 3) ultracentrifugation 없이 1 시간 이내에 최대 100배까지 렌티바이러스 농축이 가능하다. Lenti-X Concentrator는 Clontech의 Lenti-X Systems을 포함한 대부분의 렌티바이러스에 적용 가능하다.

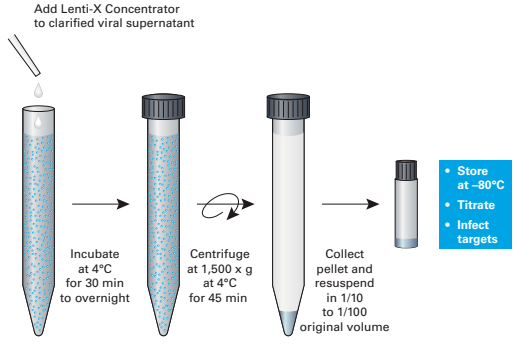


그림 3. The Lenti-X Concentrator protocol. Add Lenti-X Concentrator reagent to clarified viral supernatant, incubate for 30 min to overnight at 4°C, and spin. That's it

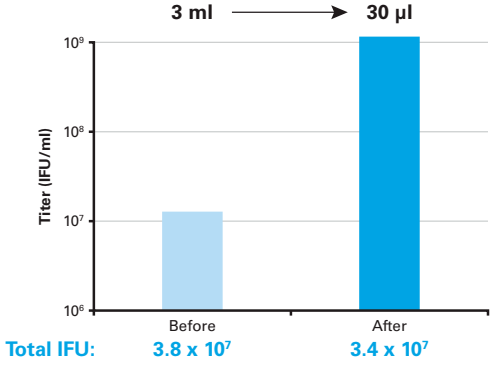


그림 4. Efficient concentration with minimal loss. Lentiviral supernatant from a pLVX-ZsGreen1 vector was concentrated from 3 ml down to 30 µl using the Lenti-X Concentrator reagent, which reflected a 100-fold increase in viral titer. Measuring the total amount of virus contained in each sample indicated that the resuspended pellet captured 90% of the virus present in the original sample. Samples were titrated using HT1080 cells and analyzed by flow cytometry 48 hr post-transduction.

Ultracentrifugation 방법에 비해 간편함

Ultracentrifugation를 이용하여 렌티바이러스를 농축하는 것보다 Lenti-X Concentrator를 이용하는 것이 보다 빠르고 편리하며 효과적이다(표1).

표1. Lenti-X Concentrator vs. Ultracentrifugation

Feature	Lenti-X Concentrator	Ultracentrifugation
Easily Scalable	Yes	No
Specialized Equipment	No	Yes
Time Required	~1 hr	4 hr to overnight
Ease-of-Use	++++	+
Yield	>90%	>90%

렌티바이러스 상층액 정제로 오염물질 제거
Lenti-X™ Maxi Purification Kit

- Gravity column 방식을 이용하여 렌티바이러스 입자 손상을 방지
- 세포 오염물질을 제거하여 transduction 효율 높임
- 최대 10배의 농축 효과와 60 ~ 80%의 회수율

Lenti-X Maxi Purification Kit를 이용하면 crude한 렌티바이러스 상층액을 gravity column-base 방법을 이용하여 빠르고 간단하며 효과적으로 렌티바이러스를 정제할 수 있다. Filter를 이용한 정제 방법은 렌티바이러스 입자에 손상을 주거나 정제량을 감소시키는데 비하여 gravity column 방식은 실험 과정이 빠르고 간편하며 효과적이다. Gravity column은 세척 과정 동안 column을 통해 부착되지 않은 물질들이 통과되고 상층액 내에 바이러스 입자들은 남아있게 되어, 정제된 바이러스는 온전한 형태와 기능을 잃지 않게 된다. 이 키트를 사용하여 바이러스를 정제하는 과정은 plasmid DNA를 정제하는 것만큼 간편하다.

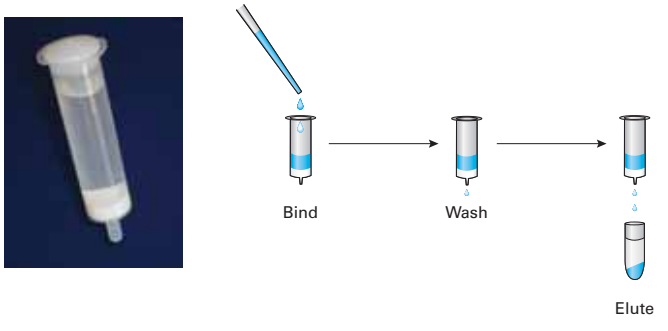


그림 5. The Lenti-X Maxi Purification Kit allows you to generate high yields of purified lentivirus from crude packaging cell supernatants. The gravity column-based method (bind, wash, elute) is extremely simpleand effective, and preserves virus infectivity much better than filter-based methods.

렌티바이러스를 정제해야 하는 이유

렌티바이러스의 정제는 실험에 영향을 미칠 수 있는 세포 오염물질을 제거할 수 있다. 정제되지 않은 렌티바이러스 상층액은 잔존 plasmid DNA, 알려지지 않은 형질 도입 저해제, 세포 내 단백질과 혈청 단백질, 고도의 면역성 바이러스 단백질, 핵산, 바이러스 단편 등을 포함하고 있

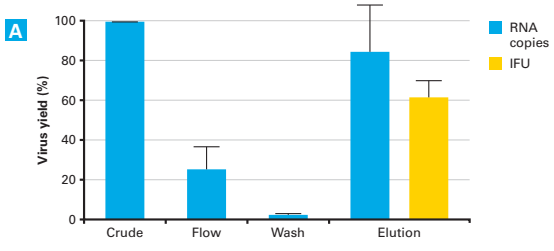
다. 민감한 목적 세포 또는 *in vivo* 적용을 위해서는 렌티바이러스를 사용하기 전에 정제하여 오염물질을 제거하는 과정이 필요하다. 정제된 바이러스를 사용하면 'pseudo-transduction' 도 방지할 수 있다.

간단한 프로토콜

Lenti-X Maxi Column은 사용하기 편리하도록 구성되어 있다. 상층액(9 ~ 45 ml)에 10 x binding buffer를 첨가한 후 column에 넣으면 중력에 의해 시료와 buffer가 통과하고, 2 회 column 세척 과정 동안 불순물들은 제거 후, 3 ml의 elution buffer로 정제된 렌티바이러스를 회수한다.

Filter system보다 뛰어난 회수력과 순도

바이러스 정제의 핵심은 바이러스의 감염력을 유지하고 뛰어난 바이러스 회수능력을 발휘하는 것이다. 일반적으로 Lenti-X column은 시료로부터 60% 이상의 감염력을 지닌 바이러스가 정제된다(그림 6). Anion exchange-based membrane system은 Lenti-X column 보다 낮은 회수능력을 보이며 종종 20% 이하의 감염력을 지닌 바이러스가 정제되는 경우도 있다. Lenti-X column은 filter system보다 높은 바이러스 순도와 매우 적은 단백질 검출을 보인다. Filter 정제 방식은 바이러스와 함께 정제된 외부 단백질을 다량 포함하고 있다(그림 7).



B

	Purification Method	Virus Yield (% of Input) qRT-PCR (RNA copies)	Fluorescence (IFU)	Ease of Use
Lenti-X	Gravity column	84.7	61.6	****
Vendor S	Syringe filter	15.1	18.9	**

그림 6. Lenti-X Maxi Purification Kit yields are far higherthan the yields of filter-based methods. Panel A. Virus contentin the indicated Lenti-X column fractions was tracked using either Lenti-X qRT-PCR (RNA copies) or flow cytometry/fluorescence (IFU) titration. The mean values from seven experiments are shown. Panel B. In a head-to-head comparison, Lenti-X column purification recovers more virus than a filter-based method.far fewer contaminating proteins at equivalent IFU than either sample prepared from the filter-based systems.

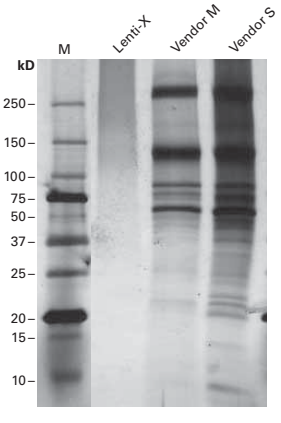


그림 7. The Lenti-X Maxi Purification Kit yields highly purified lentivirus. Equivalent amounts of purified virus (1 x 10^5 IFU) prepared using either the Lenti-X Maxi Purification Kit (Lenti-X) or a filter-based system (Vendor M & Vendor S) were subjected to SDS-PAGE and silver-stained. The Lenti-X sample clearly contained far fewer contaminating proteins at equivalent IFU than either sample prepared from the filter-based systems.

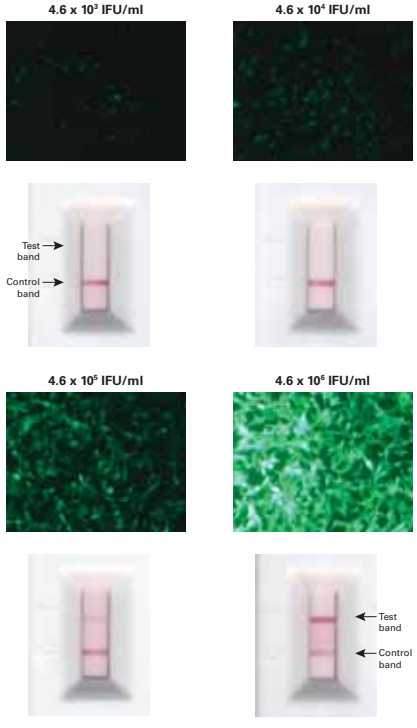
Instantly Test for Lentivirus
Lenti-X™ GoStix™

- 30 초 ~ 10 분 이내에 렌티바이러스의 역가 판단
- 바이러스 회수 최적 타이밍 판단

Lenti-X GoStix으로 측정한 민감도 범위

Clontech의 pLVX vector중 ZsGreen1 형광 단백질을 발현하는 렌티바이러스 벡터와 Lenti-X HTX Packaging System, Lenti-X 293T Cells을 이용하여 렌티바이러스를 제작 후 Lenti-X GoStix으로 바이러스의 역가를 측정하였다. 붉은색 밴드가 선명하게 나타나는 경우의 역가는 ~5 x 10^5 IFU/ml* 이다.

* 역가측정은 HT-1080 cell을 렌티바이러스를 형질도입 후 flow cytometry 이용하여 측정하였다.
* 실험의 민감도는 사용하는 역가 측정 방법이나 렌티바이러스 패키징 시스템에 따라서 달라질 수 있다.



Real Time PCR 방법을 활용한 역가 측정
Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit

- 4 시간 만에 렌티바이러스의 역가(RNA 역가) 측정 가능
- 정확한 역가 측정을 통해 재현성있는 바이러스 감염 실험 가능

Lenti-X qRT-PCR Titration Kit을 이용하면 RNA를 정제 후, SYBR Green I법을 이용한 One-Step qRT-PCR로 4시간만에 렌티바이러스의 역가를 측정 할 수 있다. 표준곡선 작성에 필요한 control RNA는 제품에 포함되어 있다. 또한 FACS나 콜로니 선별 등을 통해 바이러스의 생물학적 역가(IFU/ml)와 RNA 역가(copies/ml)와의 상관관계(copies/IFU)를 미리 계산해 두면, 측정된 RNA의 역가를 통해 2시간 만에 생물학적 역가를 추정하여 MOI(Multiplicity of Infection)를 결정할 수 있다.

ELISA법을 활용한 역가 측정

Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit

- 간단하고 빠른 ELISA기반의 역가 측정 방법

Lenti-X p24 Rapid Titer Kit는 ELISA 방법을 이용하여 HIV-1 기반의 렌티바이러스 상층액에서 역가를 측정한다. 바이러스 상층액에 존재하는 p24 capsid 단백질의 잔존량을 측정하며, 이 때 p24의 양은 바이러스 역가와 직접적인 상관관계가 있다. 렌티바이러스 상층액를 anti-p24 capture antibody로 코팅된 96-well plate(12 개의 8-well strip으로 분리 가능)에 넣고, 세척 후 결합된 p24는 biotinylated anti-p24 2차 항체와 streptavidin-HRP, 발색 시약을 첨가하여 측정한다. p24 control을 이용하여 표준 곡선을 만들고, p24를 동량으로 조정하여 상층액의 역가를 산출한다.

p24는 무엇인가?

재조합 렌티바이러스를 연구 목적으로 제작할 경우, 3세대 또는 4세대 패키징 방법을 이용한다. 재조합 렌티바이러스의 구조 단백질은 VSV-G 또는 ecotropic envelope 단백질, 매트릭스 단백질과 바이러스 코어단백질로 구성되어 있다(그림 8). Gag 유전자는 바이러스 capsid 단백질(p24)과 nucleocapsid 단백질(p6과 p7), 매트릭스 단백질(p17)을 코딩하고 있다. 이 구조단백질 중, Lenti-X p24 Rapid Titer Kit는 바이러스 상층액에 포함되어 있는 p24 단백질의 양을 측정한다.

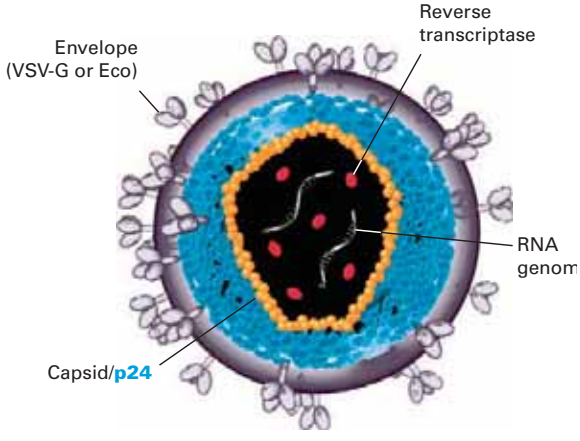


그림 8. p24 is located in the lentiviral capsid and is one of 4 proteins encoded by the HIV-1 gag gene.

삽입된 렌티바이러스의 카피수를 측정

Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit

- Transduction된 세포로부터 integrated lentivirus(provirus)의 카피수를 측정
- 실험 조건이나 세포 종류가 달라져도 형질전환시의 감염력을 일정하게 유지하기 위해 사용

렌티바이러스를 감염시킨 세포의 genomic DNA 내에 삽입된 렌티바이러스(provirus)의 카피수를 신속하게 측정하기 위한 제품이다. 프로바이러스 카피수 측정을 통해 바이러스의 실제 유효한 역가(예: 효과적인 역가)를 확인하고 정확한 MOI(multiplicity of infection)로 타겟 세포에 감염이 가능해진다.

예측 가능하고 재현성 있는 유전자 발현

렌티바이러스를 이용하여 타겟세포에 목적 유전자를 도입할 때, 바이러스의 MOI가 증가하면 유전자의 발현 레벨이 증가한다. 이는 보다 많은 렌티바이러스 카피수가 세포의 genomic DNA로 삽입되기 때문이다(그림 9). 효과적인 렌티바이러스 MOI는 각각의 cell line에 따라서 달라질 수 있다(그림 10). Lenti-X Provirus Quantitation Kit를 이용하면 유전자 레벨, cell line의 종류, 실험 시기와 상관없이 형질도입 효율을 평가할 수 있다

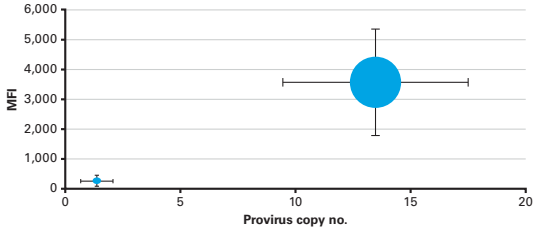


그림 9. Higher proviral content is associated with higher expression levels. Provirus content in the genomic DNAs of HT1080 cells transduced at either high or low MOI were determined using the Lenti-X Provirus Quantitation Kit. AcGFP1 expression levels (MFI) were determined using flow cytometry. The figure represents data pooled from two groups having either low-copynumber (<3; n = 8) or high-copy-number (>9; n = 7) proviruses.

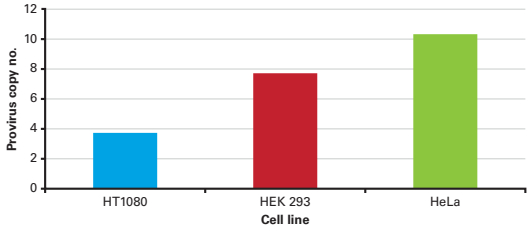


그림 10. Equivalent MOI in different cell types can result in different provirus copy numbers. HT1080, HeLa, and HEK 293 cell cultures were transduced at equivalent MOIs using a single lentiviral stock (100 µl). The provirus copy numbers in the genomic DNAs of the transduced cell populations were determined using the Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit.

Inverted PCR 분석으로 provirus 검출 확인

Lenti-X Provirus Quantitation Kit로 분석된 provirus의 카피수의 결과를 확인하기 위해 proviral insertion junctions 부분을 invert PCR(iPCR)로 증폭했다(그림 11). 예상대로 low-copy-number 클론에서는 단일 PCR 산물(~150 bp)이 생성되었으며, mixed polyclonal populations에서는 100 ~ 500bp 사이의 다양한 PCR 산물이 'smears'하게 검출되었다. 이 결과는 proviral insertion이 많이 일어났음을 의미한다. 두 종류의 실험 결과가 일치하였기 때문에, Lenti-X Provirus Quantitation 방법이 효용성이 있음을 확인하였다.

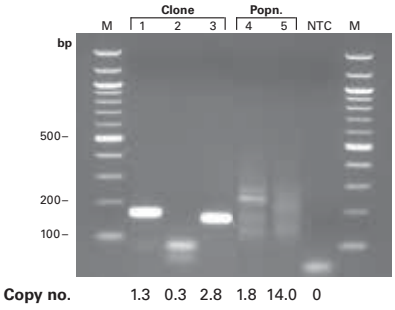


그림 11. Proviruses amplified by inverted PCR correspond to qPCR copy number. Provirus copy numbers were determined for genomic DNA purified from 106 stably transduced HT1080 cells representing either individual clones (Lanes 1-3) or polyclonal populations (Lanes 4 & 5). The DNA samples were also subjected to inverted PCR analysis to amplify individual provirus junction sequences using vector-specific primers (1). NTC = no template control.

Note: Not all proviruses can be amplified with this method.

Polybrene 없이 25분 이내에 magnetic bead를 이용하여 형질도입
Lenti-X™ Accelerator

- 렌티바이러스나 MMLV 레트로바이러스의 빠른 transduction 유도
- Stem cell과 같이 민감한 세포에 최적
- Starter Kit은 magnetic separator를 포함

Lenti-X Accelerator는 magnetic bead 기술을 기반으로 렌티바이러스와 MSCV 레트로바이러스를 포함한 MMLV 레트로바이러스의 형질도입을 촉진할 수 있도록 제작되었다. Polybrene을 이용할 경우, overnight으로 노출시켜야 하기 때문에 시간이 오래 걸리고 독성을 나타내는 반면, Lenti-X Accelerator는 세포를 바이러스 상층액(viral supernatant)에 5분 만 노출시키면 되기 때문에 stem cell과 같은 민감한 세포 적용에 최적이다.

빠르고 효과적인 형질 도입

Lenti-X vector를 이용하여 형질도입 효율을 비교해 보면 Lenti-X Accelerator는 polybrene을 이용한 것과 달리 불과 5분만에 높은 형질도입 효율을 보인다 (그림 12).

Magnetic Separator

Lenti-X Accelerator Starter Kit에는 세포배양용 플레이트에 이용할 수 있는 magnetic separator가 포함되어 있다(그림 13)

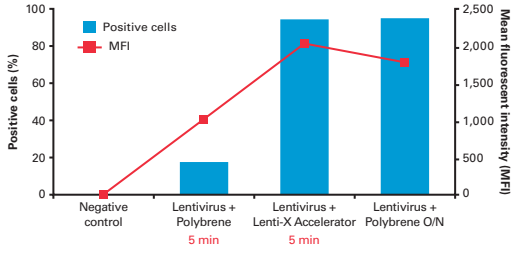


그림 12. Lenti-X Accelerator provides high transduction efficiency in a 25 min protocol. Lentiviral transduction of HT1080 cells was carried out for 5 min with Lenti-X™ Accelerator beads after a 20 min incubation to bind the beads to the virus—and for 5 min or overnight with Polybrene. After the cultures were grown for an additional 72 hr at 37°C, the number of transduced cells was determined by flow cytometry.

그림 13. A magnetic separator is included with the Starter Kit.

형질도입 방법을 변화하라
Viral Receptor Boosters

- 높은 형질도입 효율 - 일시적으로 목적 cell의 viral receptor 농도를 증가
- 간단한 프로토콜

타겟 세포에 효과적으로 바이러스를 도입하기 어려울 때가 있다. 실험실에서 주로 사용되는 3 종류의 바이러스(레트로바이러스, 렌티바이러, 아데노바이러스)는 세포 표면의 수용체 단백질을 통해서 세포 내로 도입된다. 세포 표면에 수용체 단백질이 제한적으로 존재하면 형질도입 효율이 낮아진다. Clontech의 Viral Receptor Booster 기술은 쉽고 빠르게 타겟 세포 표면에 수용체 단백질을 증가시켜 바이러스의 형질도입 효율을 증가시킬 수 있다.

Viral Receptor Boosters의 역할

Viral receptor booster는 exosome-like vesicles 또는 microvesicles형태로 세포의 세포막에 viral receptor protein을 일시적으로 증가시킨다 (그림 14). 타겟 세포 표면에 바이러스 수용체 단백질이 증가함으로써 형질도입 효율이 증가된다.

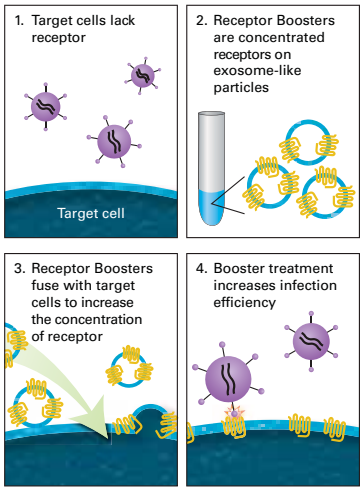


그림 14. The principle of Viral Receptor Booster technology.
Viral Receptor Boosters are concentrated exosome-like vesicles that are applied to target cells prior to infection with virus. Booster treatment increases the cell surface density of the receptor recognized by the infecting virus, thus increasing transduction efficiency. Using this technology, for example, you can coat human cells with the ecotropic receptor (which is otherwise absent), enabling them to be transduced with ecotropic retrovirus or ecotropic lentivirus.

Ecotropic Receptor Booster — human 세포에 ecotropic pseudotyped 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 감염

Viral Receptor Boosters를 이용하면 이전에 감염이 어려웠던 세포에서 바이러스의 형질 도입이 가능하다. 예를 들면, human 세포의 경우 일반적으로 mCAT-1 receptor이 발현되지 않기 때문에 ecotropic-pseudotyped 렌티바이러스 또는 레트로바이러스를 이용하여 형질 도입이 어렵다. 하지만 human cell에 ecotropic pseudotyped 렌티바이러스를 형질 도입 시키기 전에 Ecotropic Receptor Booster에 미리 처리를 하면 ecotropic lentivirus를 이용하여 human 세포에 형질도입이 가능하다(그림 15, 그림 16).

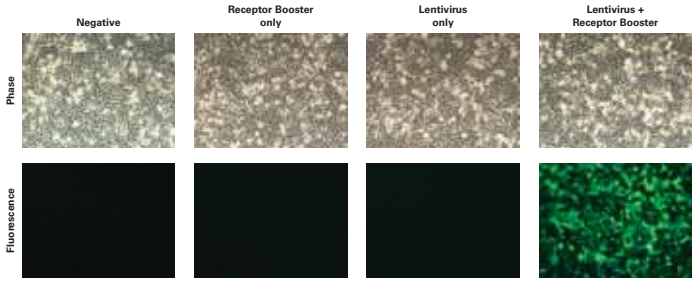


그림 15. Viral transduction of human cells with ecotropic lentivirus following Ecotropic Receptor Booster treatment. HT1080 cells were seeded in 6-well plates 24 hr prior to transduction and incubated with 10 µl Ecotropic Receptor Booster for 2 hr. Cells were then transduced with Lenti-X ZsGreen1 lentivirus (MOI=~15) produced using Clontech's Lenti-X HTX Ecotropic Packaging System (Code 631251) and assayed 48 hr later for ZsGreen1 expression.

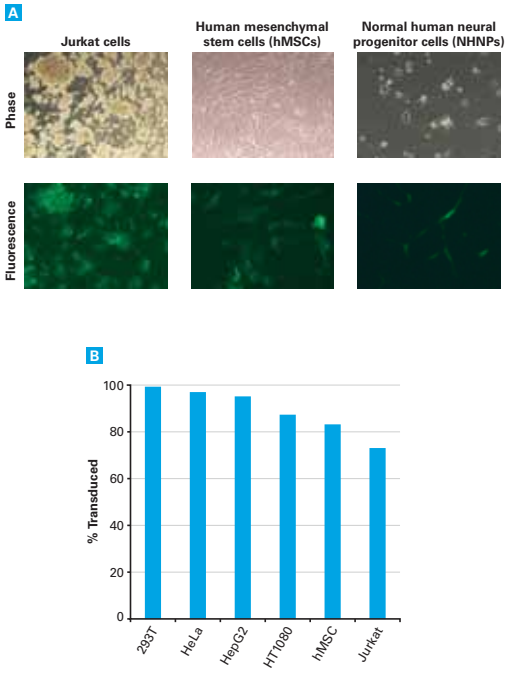


그림 16. Ecotropic Receptor Booster aides transduction of ecotropic lentivirus. Panel A. Usually, it is not possible to infect Jurkat cells, hMSCs, or NHNPs with ecotropic pseudotyped lentivirus. However, pre-treatment of these cell types with Ecotropic Receptor Booster allows for very efficient transduction. Panel B. A panel of human cell lines, normally resistant to transduction by ecotropicpseudotyped lentiviral vectors, were efficiently transduced after treatment with Ecotropic Receptor Booster.

Lenti-X™ Integration Site Analysis Kit

- GenomeWalker를 기반으로 provirus의 게놈 삽입 부위를 식별
- 대부분의 렌티바이러스 벡터에 적용 가능

Lenti-X Integration Site Analysis Kit는 GenomeWalker 기술을 기반으로 렌티바이러스 벡터가 host genome DNA에 provirus로 삽입된 부분을 정확하게 분석할 수 있다. 렌티바이러스는 RNA genome virus로서 DNA로 역전사 되어 host genome에 삽입된다. provirus는 host genome에 무작위로 삽입되기 때문에 목적유전자 및 endogenous 유전자 발현에 영향을 줄 수 있다. 따라서 provirus의 삽입부위의 식별은 host cell의 표현형 연구에 중요하다.

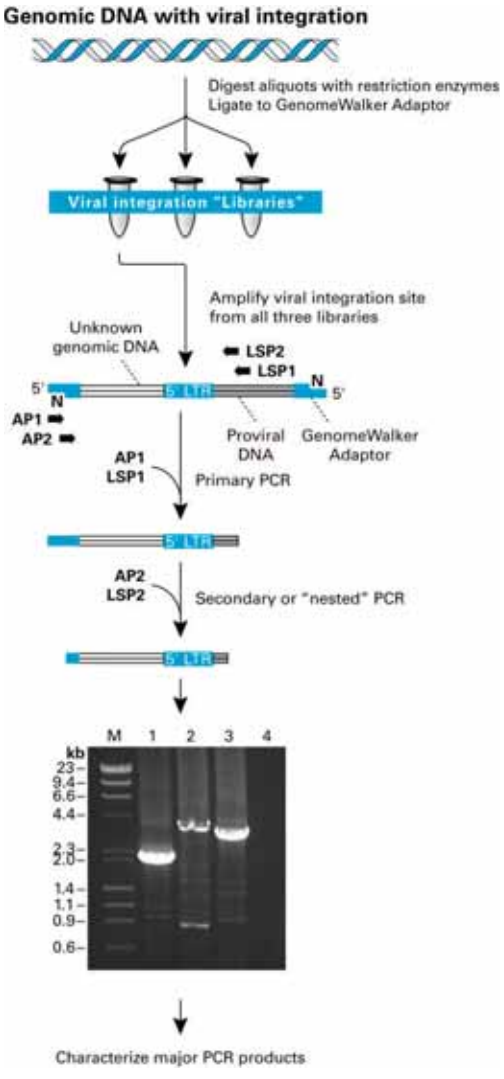


그림 17. Flow Chart of the Lenti-X Inteqratin Analysis protocol

제품 리스트

Code	제품명	용량
632164	Lenti-X Expression System	each
631253	Lenti-X Expression System (EF1alpha)	each
632181	Lenti-X Bicistronic Expression System (Neo)	each
631187	Lenti-X Tet-On 3G Inducible Expression System	each
631189	Lenti-X Tet-Express Inducible Expression System	each
632177	Lenti-X shRNA Expression System	each
631247	Lenti-X HTX Packaging System	20 회
631251	Lenti-X HTX Ecotropic Packaging System	20 회
631258	Lenti-X HTX Packaging System (Integrase Deficient)	20 회
632180	Lenti-X 293T Cell Line	1 ㎖
631231	Lenti-X Concentrator	100 ㎖
631233	Lenti-X Maxi Purification Kit	2 preps
631243	Lenti-X GoStix	20 회
631235	Lenti-X qRT-PCR Titration Kit	200 회
631239	Lenti-X Provirus Quantitation Kit	200 회
632200	Lenti-X p24 Rapid Titer Ki	96 회
631471	Ecotropic Receptor Booster	20 회
631263	Lenti-X Integration Site Analysis Kit	each

License Notice [K11, K19, K21, K25, K27, K29, K31, K38, K40, K45, K47, K62, K69, K72]

줄기세포의 재프로그래밍부터 분화까지 transfection의 적용

서론

최근 몇 년 사이 줄기세포 분화와 재프로그래밍reprogramming 분야의 발전으로 균일한 세포를 이용한 테스트가 가능해지면서 신약 개발이 가속화되고 있다. 이러한 비약적인 발전 중 일부는 다양한 세포로 핵산을 도입하는데 바이러스를 이용하지 않는 transfection 방법을 사용하고 있기 때문이다. Mirus Bio에서는 이러한 분야에 적용되었던 고효율 핵산 도입 방법인 *Trans*IT Transfection Reagents 와 Ingenio Electroporation Kit를 공급하고 있다.

줄기세포 재프로그래밍을 위한 transfection

마우스와 인간 섬유아세포human fibroblasts와 같은 체세포의 재프로그래밍을 통해 iPS(induced pluripotent stem) 세포를 유도하는 방법은 다양한 조직 분화세포를 발생시킬 수 있는 균일하고 충분한 원재료 공급을 가능하게 하였다. 인간 iPS 세포를 사용하면 법적 분쟁이나 윤리적인 논쟁 없이 hESCs(human embryonic stem cells) 를 대체할 수 있다.

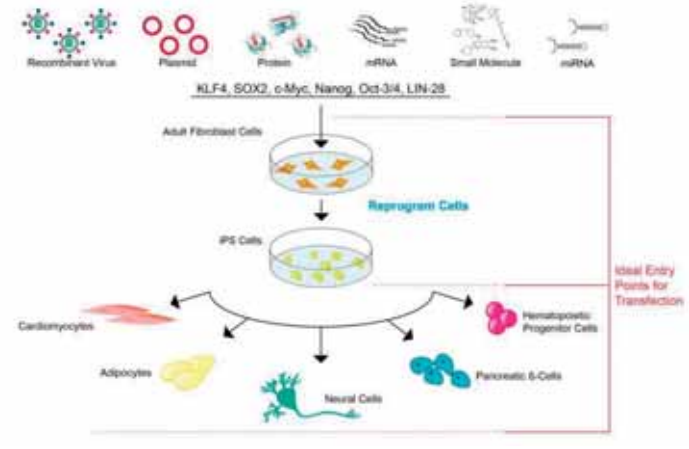


그림 1. Entry Points for Transfection. Adult fibroblast cells can be transfected or transduced via several methods (e.g. recombinant virus, plasmid, protein, mRNA, small molecule and miRNA) with a combination of transcription factors including KLF4, SOX2, c-MYC, NANOG, OCT-4 and LIN-28 to reprogram the cells to a pluripotent state. iPS cells can then be differentiated to a myriad of cell types through growth factor addition and/or transfection of selection markers driven by cell type specific promoters. Stem cell derived cell types such as cardiomyocytes, adipocytes, neural cells, pancreatic b-cells, and hematopoietic progenitor cells provide researchers with relevant models for their experiments.

또한 질병 모델이나 독성 실험과 같은 다양한 연구를 위해 특정한 유전적 환경에서 iPS 세포를 생성할 수 있다.

체세포를 iPS 세포로 재프로그래밍하기 위해서는 재조합바이러스, 소분자물질을 이용하거나, plasmid, protein, mRNA나 miRNA를 transfection하는 방법으로 핵심 transcription factor의 조합을 도입함으로써 이루어진다(그림 1). 이 transcription factor의 조합은 세포 종류에 따라 다양하다. 예를 들면, 마우스 세포의 재프로그래밍[1]을 위해서는 Klf4, Sox2, c-Myc, Oct-3/4가 필요한 반면, 인간 체세포의 재프로그래밍[2]을 위해서는 SOX2, OCT4, NANOG, LIN28가 필요하다. 초기에는 이러한 재프로그래밍 요소를 레트로바이러스를 이용해 체세포로 도입하여 높은 형질도입 효율로 재프로그래밍의 재현성을 보였으나, 게놈으로 삽입되는 바이러스이기 때문에 종양을 유발하거나 면역반응을 유도할 수 있는 위험 부담이 있었다. 이와 같은 바이러스를 이용한 형질도입에서 나타나는 문제는 화학물질을 이용한 transfection이나 electroporation 방법으로 해결할 수 있다.

화학물질을 이용한 transfection은 DNA와 RNA를 효과적으로 도입할 수 있다. DNA 매개 재프로그래밍은 삽입 방법이나 비삽입 방법 모두 적용 가능하다. PiggyBac transposons[3,4] 이나 loxP sites[5]를 이용한 삽입 방법은 세포내 게놈으로 삽입되어야 한다. 그러나 생물학적 치료를 포함하여 주요 적용 분야에서는 후속 분화에 영향을 주거나 조직 기능을 변화시킬 수 있는 게놈 삽입 과정이 없는 iPS 세포주 제작을 원한다. 형질전환유전자 발현을 위한 비삽입 방법에는 transfection으로 도입하는 episome과 DNA minicircles이 있다. 바이러스를 이용하지 않는 발현 벡터의 형질전환은 게놈으로의 삽입 가능성을 줄인 반면, 재프로그래밍이 일어나기 위해서는 매우 높은 형질전환효율이 필요하다. Mirus의 *Trans*IT-X2 Dynamic Delivery system, *Trans*IT-2020과 *Trans*IT-LT1과 같은 고효율 저독성의 transfection 시약들이 DNA를 도입하는 대체 방법이 되고 있다. 고효율 DNA 도입을 위한 electroporation법에는 Ingenio Electroporation Solution을 이용할 수 있다.

새로운 줄기세포 재프로그래밍 접근법은 게놈 삽입에 대한 우려를 완벽하게 제거하였으며, 최근 몇 년 사이에는 iPS 세포 분화를 위해 변형된

염기를 가진 mRNA로 섬유아세포의 transfection까지 성공하였다.[6] *In vitro* transcritpts내에 pseudouridine과 5-methylcytosine과 같은 변형된 염기를 포함하는 것은 mRNA의 안정성을 증가시키고 동시에 형질전환된 세포에서 면역반응은 감소하는 것으로 알려졌다.[7,8] 이같은 변형된 mRNA의 반복적 도입은 게놈 삽입 우려 없이 높은 재프로그래밍을 이끈다. 더구나 Mirus의 *Trans*IT-mRNA Transfection Kit와 같은 저독성 RNA 형질도입 시약을 사용함으로써 반복적 transfection에 따른 세포독성이 경감되었다.[9,10]

재프로그래밍에 일반적으로 사용되는 BJ와 MRC-5 fibroblast cell line의 transfection에 *Trans*IT mRNA Transfection Kit을 사용하였다(그림 2). 이 실험에서 고효율로 형질전환되는지 확인하기 위해 pseudouridine과 5-methylcytosine으로 변형된 GFP 코딩 RNA transcripts를 transfection하였다. 추가로 propidium iodide 염색으로 transfection의 독성이 낮음을 확인하였다.

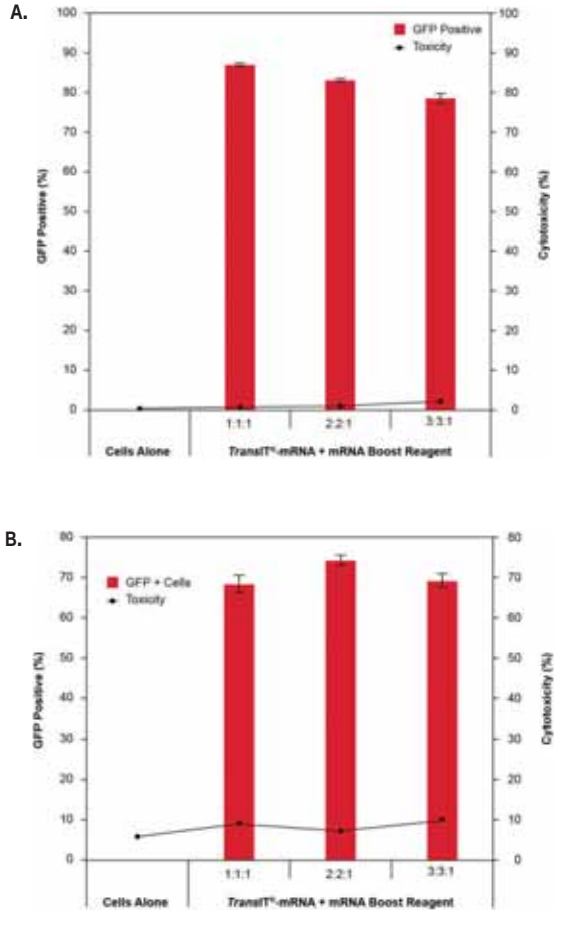


그림 2. Fibroblast Transfection with *Trans*IT-mRNA. The *Trans*IT-mRNA *Trans*-fection Kit was used to transfect BJ human neonatal foreskin fibroblasts (A) and MRC-5 human lung fibroblasts (B) with a pseudouridine and 5mC modified based GFP mRNA (Trilink Biotechnologies, Inc.). Transfections were performed in 12-well plates using 1-3 µl of *Trans*IT-mRNA Transfection Reagent and mRNA Boost Reagent to deliver 1 µg of RNA (1:1:1, 2:2:1 and 3:3:1; reagent: boost: RNA ratio). Cells were assayed 18 hours post-transfection on a Guava HT easyCyte flow cytometer. Toxicity was measured using propidium iodide stain (black line).

iPS 세포 분화에 적용 가능한 transfection

재프로그래밍된 체세포에서 형성되는 iPS 세포는 다양한 조직에 적합한 세포로 분화된다. iPS 세포가 특정 세포로 분화될 때는 정해진 배양조건이 필요하며, 이 방법은 세포 종류에 특화된 프로모터에 의해 유도되는 선별마커를 transfection을 통해 도입함으로써 더 간소화하였다.

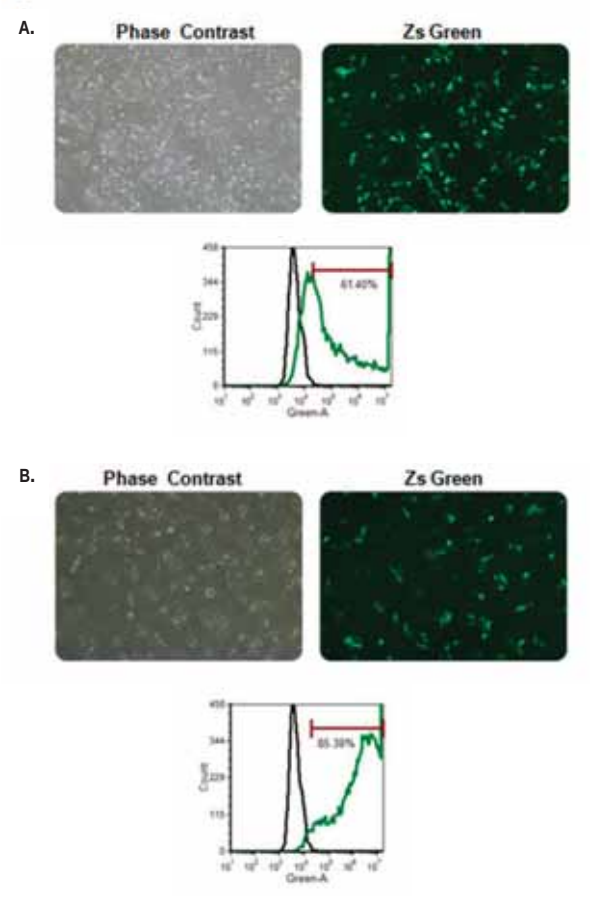


그림 3. High Efficiency Transfection and Electroporation of Human iPS Cells. The *Trans*IT-2020 Transfection Reagent was used to transfect 0.5 x 10^6 iPS cells with a ZsGreen expression plasmid (Clontech) (A). Transfections were performed in 6-well plates using 7.5 µl of *Trans*IT-2020 Transfection Reagent to deliver 2.5 µg of DNA (3:1; reagent: DNA). The Ingenio Electroporation Kit was used to transfect 2 x 10^6 iPS cells on the Amaxa Nucleofector II Device (B). Cells were electroporated with 8 µg ZsGreen expressing plasmid (Clontech) in 100 µl and plated in 6-well plates at 0.33 x 10^6 cells/well. Cells were visualized 24 hours post-transfection and imaged at 4X objective with an Olympus IX71 Inverted Microscope. Images were acquired using phase contrast and green fluorescence. Cells were assayed 24 hours post-transfection on an Accuri Cytometer. The histogram shows untransfected cells (black line) compared to cells transfected with plasmid (green line).

iPS 세포로의 고효율 transfection은 Cellular Dynamics International(CDI – www.cellulardynamics.com)의 연구자에 의해 ZsGreen expressing plasmid(Clontech)를 iPS 세포에 transfection 시킨 데이터를 통해 확인하였다(그림 3). 실험 결과는 *Trans*IT-2020 Transfection Reagent 또는 Ingenio Electroporation Kit를 이용한 electroporation법으로 iPS 세포가 효과적으로 형질전환된 것을 보여준다. 이 방법들은 효과적인 핵산 도입 방법을 선택하고 결정하는데 도움을 준다.

iPS 세포로부터 유도된 세포주

iPS 세포로부터 유도된 세포주는 무한증식세포주immortalized cell line 보다 생물학적으로 더 적합하다. 이 세포들은 특정 질병모델 연구, 약물 작용이나 독성스크리닝 등에 primary cell보다 더 균일하게 작용한다. iPS 세포유도체를 이용하면 비싼 동물실험을 인도적인 방법으로 대체할 수 있다. 또한 최근 iPS 세포에서 유도된 cardiomyocytes와 신경세포는 신약개발이나 독성 테스트 적용에 관심을 받고 있다.[11]

iPS 유래 세포를 화합물의 선별이나 유전자 발현을 knockdown시켜 pathway 분석 실험에 이용하고자 할 때 리포터를 도입하기 위해 transfection 방법을 이용할 수 있다. 두 실험 모두 CDI의 iCell Cardiomyocytes로 검증되었다. 그림 4에서는 iPS 세포에서 유도된 cardiomyocytes에 cardiomodulator로 알려진 isproterenol에 즉각 대응하는 luciferase 시스템을 *Trans*IT-LT1 Transfection Reagent로 transfection시킨 결과를 보여준다. 또한 *Trans*IT-TKO Transfection Reagent는 iCell cardiomyocytes내 housekeeping 유전자인 GAPDH의 발현을 억제시키는데 사용되었다(그림 5).

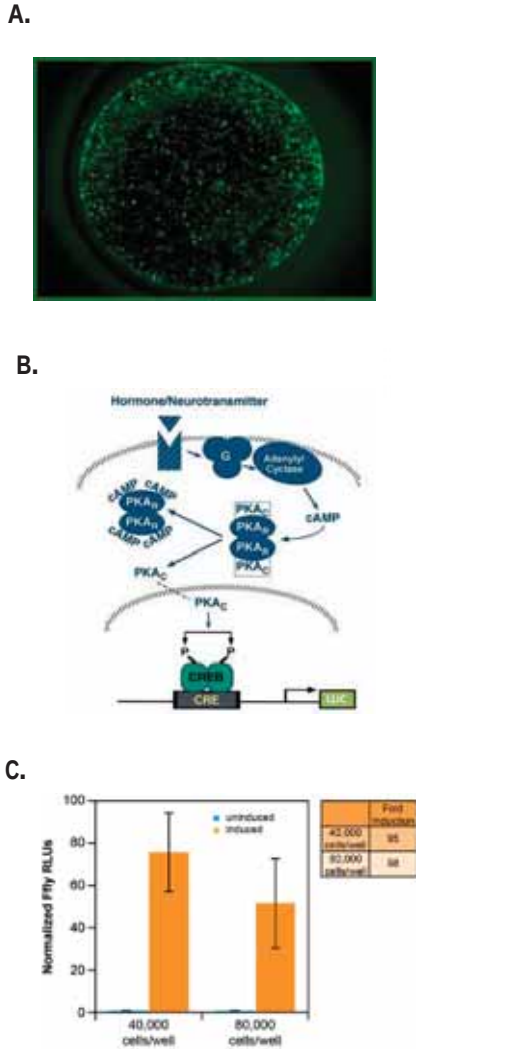


그림 4. Plasmid DNA Delivery to iCell Cardiomyocytes using *Trans*IT-LT1. Panel A illustrates high efficiency transfection of a GFP encoding plasmid. iCell Cardiomyocytes were plated at 20,000 cells/well in a 96 well tissue culture plate coated with 0.1% gelatin. After allowing the cells to recover from thaw, cells were transfected with 100 ng/well of pMAXGFP(Amaxa) using *Trans*IT-LT1 Transfection Reagent with a 2:1 (reagent:DNA) ratio according to the manufacturer's instructions. Fluorescent images were taken 3 days post transfection.
Panel B is a schematic of agonist binding inducing G protein (Gs) mediated activation of adenylyl cyclase which converts ATP to cAMP. The second messenger is able to bind to protein kinase A (PKA) and lead to phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) protein. Upon translocation to the nucleus CREB is able to bind the cAMP response element (CRE) and initiate expression of the luciferase reporter.
Panel C illustrates cAMP induction measured via a luciferase reporter plasmid. iCell Cardiomyocytes were plated for 5 days and subsequently replated using 40,000 or 80,000 cells/well in a 96 well plate pre-coated with gelatin. Three days post-replating cells were transfected using *Trans*IT-LT1 and the CRE-luciferase reporter plasmid pGL4.29 (Promega). After 18 hours the cAMP pathway was induced using 10 mM isoproterenol for 6 hours. Luciferase activity was measured using the Promega Dual Glo Luciferase Assay. Data is normalized to the control reporter plasmid pGL4.75 (Promega).

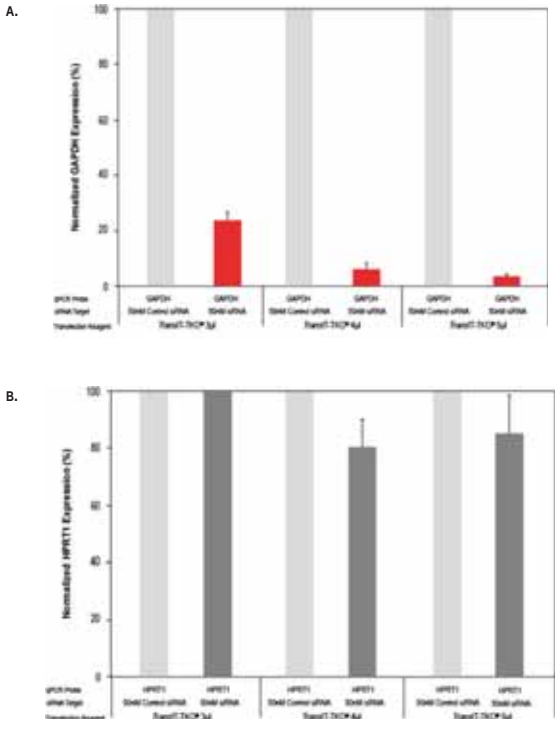


그림 5. Efficient siRNA-mediated Gene Silencing by *Trans*IT-TKO in iCell Cardiomyocytes. Panels A and B show the effect of GAPDH-targeted siRNA on GAPDH (targeted) and HPRT1 (non-targeted) mRNA expression, respectively. iCell Cardiomyocytes were cultured for 7 days in a 12-well cell culture plate before transfection with either control (scrambled) or GAPDH siRNA (sense: GCUCAUUUCCUGGUAUGACUU; antisense: GUCAUACCAGGAAAUGAGCUU) using *Trans*IT-TKO (3 - 5 µl/well). 72 hours post-transfection the GAPDH and HPRT1 (non-targeted) mRNA levels were measured relative to 18s rRNA levels and normalized to the mRNA levels obtained following transfection of the control siRNA in each experiment. The bar graphs show the mean with standard error of the mean (SEM) of 3 independent transfection complexes

결론

줄기세포를 적용할수 있는 잠재적인 응용 분야는 지속적으로 증가하고 있으며, transgene의 삽입 없이 균일한 세포군을 생산할 수 있는 새로운 기술의 개발이 요구되고 있다.
화학물질을 이용하거나 electroporation으로 transfection하는 방법은

줄기세포나 iPS 세포 그리고 iPS 세포에서 유도된 세포를 유전적으로 조작하기 위한 강력한 방법으로 떠오르고 있다. Plasmid 도입은 비삽입된 세포주 선별이 어렵고, 변형된 mRNA transfection은 복수의 샘플로 반복적으로 진행해야 하기 때문에 시간이 많이 소요된다. 하지만 바이러스를 이용한 형질도입시 발생할 수 있는 심각하고 장기적인 영향에 비해 매우 미미한 부분이다. 이러한 중요한 차이점 때문에 신약을 개발하고 세포치료에 적용하는 분야에서 줄기세포 연구에 있어 transfection 방법이 선호되고 있다.

관련제품

Code	제품명	용량
MIR 6000	*Trans*IT-X2 Dynamic Delivery System	1.5 ml
MIR 2300	*Trans*IT-LT1 Transfection Reagent	1 ml
MIR 5400	*Trans*IT-2020 Transfection Reagent	1 ml
MIR 2150	*Trans*IT-TKO Transfection Reagent	1.5 ml
MIR 2250	*Trans*IT-mRNA Transfection Kit	1.0 ml
MIR 50111	Ingenio Electroporation Solution	25 회용

License Notice [www.mirusbio.com 참조]

Reference

1. Takahashi and Yamanaka. *Cell* 126: 663-676 (2006)
2. Yu, J. *et al. Science* 318: 1917-1920 (2007)
3. Woltjen, K. *et al. Nature* 458: 766–770 (2009).
4. Yusa, K. *et al. Nature Methods* 6: 363–369 (2009)
5. Kaji, K. *et al. Nature* 458: 771-774 (2009)
6. Warren, L. *et al. Cell Stem Cell* 7: 618-630 (2010)
7. Kariko K. *et al. Immunity* 23: 165-175 (2005)
8. Kariko K. *et al. Mol Ther.* 15: 1833-184 (2008)
9. Angel and Yanik. *PLoS one* 5: e11756 (2010)
10. Kariko, K. *et al. Nucl. Acids Res.* 39: e142 (2011)
11. Ebert and Svendsen. *Nature Reviews Drug Discovery* 9: 367-372 (2010)

Cloning 실험 가이드

TA cloning에서 In-Fusion cloning까지

Cloning의 개요

타겟 유전자를 임의의 vector에 넣는 cloning 실험은 유전자 공학실험의 기초 기술 중 하나이며 다양한 연구분야에서 이용되고 있다. 제한효소 발견과 그 응용에 의해 cloning은 범용성이 높은 기술로 이용되어 오고 있고, 최근에는 제한효소 처리없이 원하는 vector에 직접 directional cloning이 가능한 In-Fusion cloning이 개발되어 한층 더 편리하게 활용할 수 있게 되었다. 또 cloning 실험에서는 샘플로부터 게놈 DNA 혹은 RNA의 추출 및 정제, 역전사 반응에 의한 cDNA 합성, PCR에 의한 DNA 단편 증폭 등을 통해 insert DNA를 얻는 것도 중요한 과정이다. 본 내용에서는 범용적인 TA cloning 방법(p31), 제한효소를 이용한 전통적인 cloning 방법(p33), 최신 방법인 In-Fusion cloning(p35)은 물론, cloning 전후에 필요한 실험과정(Agarose gel 전기영동, DNA 정제, cDNA 합성 (p39), PCR, colony PCR 등)도 아울러 소개하고자 한다.

Cloning 방법	Insert DNA의 말단구조	Vector 준비
TA Cloning	3' 말단에 dA tailing이 가능한 PCR 효소로 반응을 실시한다. 평활말단 증폭 산물에는 dA를 첨가하는 반응이 필요하다. 삽입 방향은 결정할 수 없다.	3' 말단에 dT가 부가되어 있는 vector를 이용한다.
제한효소 / Ligation	DNA 단편의 양끝에 제한효소 사이트가 필요하며, 서로 다른 제한효소를 이용하면 방향성 있는 삽입이 가능하다.	DNA 단편 양끝을 적절한 제한효소로 처리한다. 처리 후, 정제나 탈인산화가 필요한 경우가 있다
In-Fusion Cloning	Vector의 말단 15 base와 상보적인 서열을 부가한 PCR primer로 target DNA를 증폭한다. 어떤 vector로도 방향성 있는 삽입이 가능하다.	어떤 vector든지 사용 가능하며 vector를 제한효소 처리나 PCR을 이용해 linear 형태로 준비한다.

표 1. 각 Cloning 방법의 특징

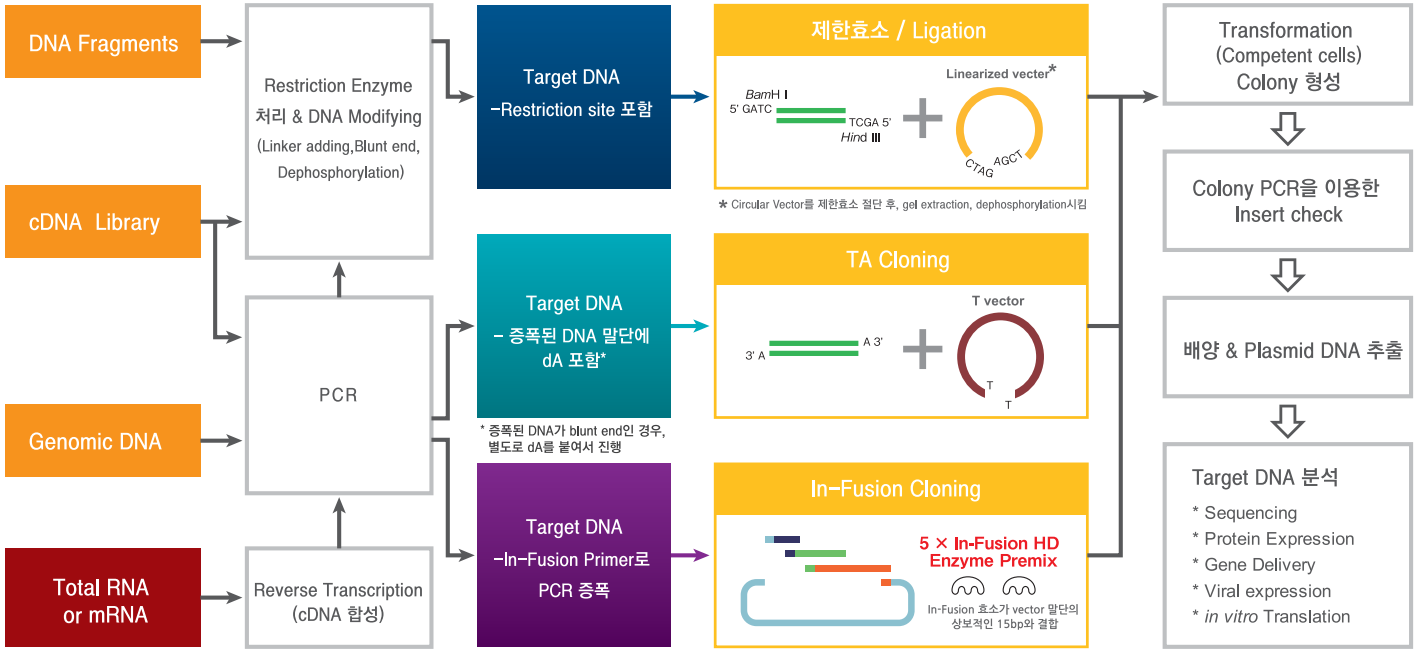


그림 1. Cloning 실험의 flow chart

TA Cloning

Taq DNA Polymerase와 같은 PCR 효소로 증폭된 PCR 산물은 3' 말단에 deoxyadenosine(dA)이 1 base 부가된다. TA cloning은 3' 말단에 deoxythymidine(dT) 1 base를 부가한 T-vector와 PCR 증폭산물의 dA 1 base가 상보적으로 결합하는 것을 이용해, 간편하게 cloning하는 방법이다 (insert DNA 5 ' 말단의 인산화는 불필요하다).

[실험방법]

1. Insert DNA 준비

① PCR에 의한 증폭 (*TaKaRa Ex Taq* 사용의 경우)

10 × *Ex Taq* Buffer (Mg^{2+} plus)	5 μℓ
dNTP Mixture (각 2.5 mM)	4 μℓ (각 200 μM)
primer 1	0.2~1 μM (final conc.)
primer 2	0.2~1 μM (final conc.)
주형 DNA	<500 ng
TaKaRa Ex Taq	1.25 U
dH_2O	up to 50 μℓ (가볍게 tapping)

98℃ 10 sec.
55℃ 30 sec.
72℃ 1 min/kb
] 30 cycles

※ PrimeSTAR 와 같은 α형 PCR 효소는 3 ' 말단에 dA가 부가되지 않기 때문에 주의가 필요하다,

② Agarose gel에 전기영동하여 증폭산물을 확인한다.
- 증폭산물이 single band인 경우는 다음 단계 「2. T vector와 ligation」에 따라 진행한다.
- Primer dimer나 비특이적인 band가 확인되었을 경우에는 전기영동 후 agarose gel로부터 목적 DNA 단편의 band를 잘라 DNA를 정제한다.

③ 잘라낸 gel에서 DNA를 정제한다 (TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extration Kit).

④ 회수한 DNA를 insert DNA 용액으로 한다.

2. T-Vector와 Ligation

Mighty TA-cloning Kit 사용할 경우

① 새로운 tube에 아래 구성물을 준비한다.

dH_2O	3 μℓ
pMD20-T Vector	1 μℓ (50 ng)
정제한 PCR 산물 (Insert DNA 용액)	1 μℓ

② Ligation Mighty Mix를 5 μℓ 첨가하여 부드럽게 혼합한다.

③ 16℃에서 30 분간 incubation 한다.

3. 형질전환 (Transformation)

E. coli HST08 Premium Competent Cells 사용할 경우

① HST08 competent cell 100 μℓ를 사용 직전에 얼음 위에서 융해해 안정화 시킨 후, 14 ml tube로 옮긴다(vortex 불가).

② Ligation 반응 용액 10 μℓ를 첨가해 얼음에서 30 분간 방치한다.

③ 42℃에서 45초간 heat shock 후, 얼음에서 1~2 분간 방치한다.

④ 미리 37℃로 맞춰놓은 SOC media를 최종 1 mℓ이 되도록 첨가한다.

⑤ 37℃ shaking incubator에서 1시간 배양한다 (160 ~ 225 rpm).

⑥ LB plate(LB+Amp+X-Gal)에 적당량을 spreading 한후, 37℃에서 하루 동안 배양한다.

⑦ Blue/White colony 선별을 통해 white colony를 선택한다.

※ *E.coli* JM109를 사용하는 경우는 Ampicillin, X-Gal, IPTG를 첨가한 LB plate에 spreading한다. 37℃에서 하루동안 배양해 Blue/White colony 선별을 통해 white colony를 선택한다.

4. Insert Check PCR

EmeraldAmp PCR Master Mix 사용할 경우

① PCR 반응액을 준비한다.

EmeraldAmp PCR Master Mix (2 × Premix)	25 μℓ
Forward Primer	0.2 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2 μM (final conc.)
dH_2O	up to 50 μℓ

② Plate 상의 colony를 tip의 앞쪽으로 극소량 긁어내어 ①의 PCR 반응액에 현탁하여 증폭한다

98℃ 10 sec.
55℃ 30 sec.
72℃ 1 min/kb
] 30 cycles

③ PCR 반응액 일부를 agarose gel 전기영동으로 insert를 확인한다.

5. 배양, Plasmid 정제

① 목적 plasmid를 포함하는 colony를 2 ml LB(+Amp)배양액에 접종하여 하루 동안 배양한다

② Plasmid DNA를 정제한다(TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit).

PCR 효소 종류와 PCR 산물 말단과의 관계

PCR DNA Polymerase는 크게 2가지 종류로 나눌 수 있다. *Taq* DNA Polymerase로 대표되는 Pol I형(family A) 효소와 Pfu DNA Polymerase로 대표되는 α형(family B) 효소이다.
Pol I 형 DNA polymerase와 Pol I 형 기반의 개량된 PCR 효소(*TaKaRa Ex Taq* 등)의 증폭산물 대부분은 3 ' 말단에 deoxyadenosine (dA) 1 base가 부가된다. 이것을 이용해 PCR 산물을 그대로 TA cloning에 사용할 수 있다.

반면, α형 DNA polymerase를 이용한 PCR 증폭산물 대부분은 효소의 강력한 3' →5' exonuclease 활성에 의해 평활말단이 되므로, 그대로는 TA cloning에 사용할 수 없다. 평활말단의 PCR 산물을 TA cloning에 이용할 경우에는 3 ' 말단에 dA를 별도로 붙여줘야 한다.
다카라에서는 TA cloning용 시약 Mighty TA Cloning Kit (Code 6028)와 α형 DNA Polymerase로 증폭한 산물을 위한 TA cloning 시약 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR(Code 6019)를 판매하고 있다. 본 키트(Code 6019)에는 평활말단으로 되어 있는 PCR 증폭산물의 3 ' 말단에 dA를 부가하기 위한 A-overhang mixture가 첨부되어 있어 간단한 과정으로 TA cloning이 가능하다.

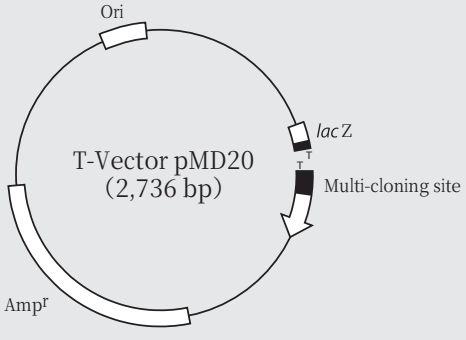
PCR 효소 종류	Pol I 형 (family A)	α형 (family B)
증폭산물의 3' 말단	dA 부가 (TA Cloning 가능)	평활말단
효소명	*TaKaRa Ex Taq* *TaKaRa LA Taq* *TaKaRa Taq* MightyAmp 시리즈 EmeraldAmp SapphireAmp SpeedSTAR	PrimeSTAR 시리즈

T-Vector에 대하여

TA Cloning Kit 외에 2 종류의 T-vector인 T-Vector pMD20과 T-Vector pMD19(Simple)을 별도 판매하고 있다. 모두 형질전환 후 Blue/White 선별이 가능하다.
T-Vector pMD19(Simple)은 pUC19에 유래의 multicloning site의 모든 제한효소 사이트를 제거하였기 때문에, cloning 후 insert 내의 제한효소 사이트를 이용하는 경우 편리하다.

5 kb 이상의 PCR 산물의 Cloning

긴 단편의 PCR 산물(5 kb 이상)의 경우는 TA cloning 효율이 저하되기 때문에, 평활말단 cloning을 추천한다. Mighty Cloning Reagent Set(Blunt End)(Code 6027)를 사용하면 말단평활화와 인산화를 간편하게 할 수 있다.



[관련제품리스트]

구분	Code	제품명	용량
TA Cloning Kit 및 T vector	6028	Mighty TA-Cloning Kit	20 회
	6019	Mighty TA-Cloning Reagent set for PrimeSTAR	20 회
	3270	T-Vector pMD20	1 μg
	3271	T-Vector pMD19 (Simple)	1 μg
형질전환용 Competent cells	9128	*E. coli* HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μℓ × 10)
	9052	*E. coli* JM109 Competent Cells	1 Set (100 μℓ × 10)
	9057	*E. coli* DH5α Competent Cells	1 Set (100 μℓ × 10)
Insert Check PCR	RR300A	EmeraldAmp PCR Master Mix	160 회
	RR310A	EmeraldAmp GT PCR Master Mix	160 회
전기영동	5003	Agarose L03 「TAKARA」	100 g
	3422A	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	500 μℓ (100 회)
	3403	λ-*Hin*d Ⅲ digest	100 μg
DNA 정제	9760A	TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit	50 회
	9761A	TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit	50 회
	9762A	TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit	50 회

제한효소 / Ligation을 이용한 Cloning

목적 DNA 단편을 원하는 plasmid vector에 삽입하는 cloning 방법은 유전자 공학실험의 가장 기본이 되는 기술이다.
여기에서는 제한효소와 T4 DNA ligase(DNA Ligation Kit)를 이용한 cloning을 소개하고자 한다.

[실험방법]

1. Insert DNA 준비 (목적 DNA 단편 조제)

(a) 제한효소를 이용한 DNA의 cutting

목적 DNA 단편의 제한효소 사이트를 확인한 후, 사용할 plasmid vector의 cloning 사이트에 맞춰 제한효소를 선정한다.

제한효소 *Hin*d Ⅲ와 *Bam*H Ⅰ을 이용한 double digestion의 예

① 반응액을 조제한다.

DNA	(≤ 1 μg)
*Hin*d Ⅲ	1 μℓ
*Bam*H Ⅰ	1 μℓ
10 x K buffer	2 μℓ
dH_2O	up to 20 μℓ (가볍게 tapping)

② 37℃ 에서 1시간 반응한다.

③ Agarose gel 전기영동으로 확인한다.
※ 반응액의 절반 정도(10 μℓ정도)에 loading buffer를 첨가하여 전기영동한다.

④ 목적 DNA 단편이 포함된 gel을 잘라낸다.
※ DNA의 손상을 줄이기 위해, UV 노출은 최대한 줄인다.

⑤ 잘라낸 gel에서 DNA를 정제한다(TaKaRa MiniBEST Agarose Gel Extration Kit).

⑥ 정제한 insert DNA 용액을 [A]로 한다

(b) PCR을 이용한 증폭

Vector와의 ligation에 사용하는 제한효소 사이트를 insert primer의 5'말단에 추가*하였다. 이 primer를 이용해서 insert DNA를 PCR 증폭한다.
*제한효소 사이트 + 5'말단에 3 base 이상 nucleotide첨가

TaKaRa Ex Taq Hot Start Version를 사용한 예

① PCR 반응액을 조제한 후 반응한다.

10 × *Ex Taq* Buffer (Mg^{2+} plus)	5 μℓ
dNTP Mixture (각 2.5 mM)	4 μℓ (각 200 μM)
primer 1	0.2 ~ 1.0 μM (final conc.)
primer 2	0.2 ~ 1.0 μM (final conc.)
DNA	<500 ng
TaKaRa Ex Taq HS	1.25 U
dH_2O	up to 50 μℓ (가볍게 tapping)

98℃ 10 sec.
55℃ 30 sec.
72℃ 1 min/kb
] 30 cycles

② 제한효소를 이용하여 DNA 단편의 양쪽 말단을 절단한다.
(필요에 따라 반응용량 조절)

①의 PCR 반응액	≦ 2 μℓ
*Hin*d Ⅲ	1 μℓ
*Bam*H Ⅰ	1 μℓ
10 × K Buffer	2 μℓ
dH_2O	up to 20μℓ (가볍게 tapping)

③ 37℃ 에서 1시간 반응한다.

④ 잘라낸 gel에서 DNA를 정제한다(TaKaRa MiniBEST Agarose Gel Extration Kit).

⑤ 정제한 insert DNA 용액을 [A]로 한다

2. Vector plasmid의 준비

① 목적 plasmid vector (circular)의 cloning 사이트를 제한효소로 절단하여 벡터를 linear화 한다.

Plasmid DNA	(≦ 1 μg)
*Hin*d Ⅲ	1 μℓ
*Bam*H Ⅰ	1 μℓ
10 × K Buffer	2 μℓ
dH_2O	up to 20 μℓ (가볍게 tapping)

② 37℃ 에서 1시간 반응한다.

④ 반응액으로부터 DNA를 정제한다.

⑤ TE Buffer (20 μℓ이하)에 용해하여 plasmid DNA 용액 [B]로 한다.

! 한 종류의 제한효소로 insert DNA 조제와 plasmid vector를 linear화하는 경우에는 linear화 한 vector의 self-ligation을 방지하기 위해 아래와 같이 탈인산화 처리한다.

탈인산화 처리 (self ligation 방지)

제한효소로 절단한 plasmid vector	1 ~ 20 pmol
Alkaline Phosphatase (BAP)	0.3 ~ 0.6 U
10 × BAP Buffer	5 μℓ
dH_2O	up to 50 μℓ (가볍게 tapping)

↓
37 ~ 65℃ 에서 30 분간 반응
↓
Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 추출 (2회)
↓
Chloroform / Isoamyl alcohol (24 : 1) 추출 (1회)
↓
에탄올 침전
↓
TE Buffer (20 μℓ 이하)에 용해하여 plasmid DNA 용액 [B]로 한다.

※ 5'-돌출말단의 탈인산화는 CIAP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)에 의한 처리로도 충분하지만, 평활말단이나 3'-돌출말단의 탈인산화에는 BAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)의 사용을 권장한다.

3. Insert DNA와 linear plasmid의 ligation

DNA Ligation Kit〈Mighty Mix〉를 사용할 경우
① 반응액을 조제한다.

Insert DNA 용액 [A]	25~250 fmol
Plasmid DNA 용액 [B]	50 ng (25 fmol)
Ligation Mix	7.5 μℓ
dH_2O	up to 15 μℓ

② 16℃, 30 분 반응 (또는 25℃, 5 분 반응)한다.

4. 형질전환 (Transformation)

E. coli HST08 Premium Competent Cells을 사용하는 경우
① HST08 competent cell 100 μℓ를 사용 직전에 얼음 위에서 융해해 안정화 시킨 후, 14 ml tube로 옮긴다(vortex 불가).
② Ligation 반응 용액 10 μℓ를 첨가해 얼음에서 30 분간 방치한다.
③ 42℃에서 45초간 heat shock 후, 얼음에서 1~2 분간 방치한다.
④ 미리 37℃로 맞춰놓은 SOC media를 최종 1 mℓ이 되도록 첨가한다.
⑤ 37℃ shaking incubator에서 1시간 배양 (160 ~ 225 rpm)한다.
⑥ LB plate(항생제 포함)에 적당량을 spreading 하고, 37℃에서 하루 동안 배양한다.

5. Insert Check PCR

31쪽의 「4.Insert Check PCR」 참조

6. 배양, Plasmid 정제

31쪽의 「5.배양, Plasmid 정제」 참조

자주하는 질문

Q Ligation이나 형질전환 효율이 떨어졌을 때에 변경할 수 있는 과정은?

A
- Ligation 반응 시간을 늘린다.
- DNA 용액내에 염salt 농도가 높으면 ligation 효율이 저하된다. 특히 에탄올 침전시 사용되는 ammonium acetate는 ligation시 저해 작용을 하기 때문에, 에탄올 침전시 염이 남지 않게 깨끗이 처리한다.
- DNA 추출 kit를 사용했을 경우, 추출액을 에탄올로 침전하고 버퍼를 교환하면 ligation 효율을 높일 수 있다.
- 돌출말단cohensive end의 ligation의 경우 DNA 용액(vector+insert DNA)을 60~65℃에서 2~3 분 정도 incubation 후, 바로 차갑게 유지한 상태에서 Ligation Kit의 각 시약을 첨가해 반응을 하면, ligation에 효율적인 돌출말단cohensive end이 확보되어 형질전환 효율이 높아질 가능성이 있다.

위의 조작으로 ligation 효율이 개선되지 않을 경우에는 DNA 정제를 다시 하는 것을 권장한다.

Q 긴 단편의 cloning시 유의할 점은?

A 긴 단편은 ligation 효율이 저하되는 경향이 있다. TaKaRa DNA Ligation Kit LONG(Code 6024)은 긴 단편 ligation에 최적화되어 있어, 10 kb 이상의 ligation을 하는 경우에 적합하다. 또한 insert DNA를 포함한 plasmid의 전체 길이가 큰 경우 (특히, 10 kb를 넘는 경우)에는 대장균으로의 도입 효율이 낮아지고, 대장균내에서의 plasmid의 안정성도 떨어지므로, 정확한 clone을 확보하기 어려워진다. 이러한 경우에는 큰 사이즈의 DNA를 효율적으로 형질전환할 수 있는 *E.coli* HST08 Premium Competent Cells(Code 9128)의 사용을 권장한다.

[관련제품리스트]

구 분	Code	제품명	용 량
제한효소, 탈인산화	1060A	*Hind* III	10,000 U
	1010A	*Bam*H I	10,000 U
	2120A	Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75)	50 U
	2250A	Alkaline Phosphatase (Calf intestine)	1,000 U
PCR	RR006A	*TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version	250 U
Ligation, 형질전환	6023	DNA Ligation Kit 〈Mighty Mix〉	1 Kit
	6024	TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit
	9128	*E. coli* HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μℓ × 10)
	9052	*E. coli* JM109 Competent Cells	1 Set (100 μℓ × 10)
전기영동	5003	Agarose L03 「TAKARA」	100 g
	3407A	100 bp DNA Ladder	500 μℓ (100 회)
	3403	λ-*Hind* III digest	100 μg
DNA 정제	9760A	TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit	50 회
	9761A	TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit	50 회
	9762A	TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit	50 회

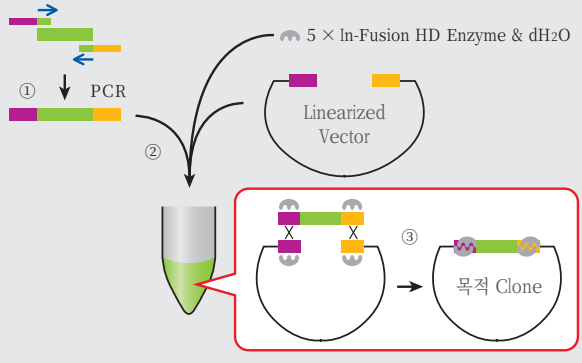
License Notice [L15] [M57]

In-Fusion Cloning

Clontech의 In-Fusion Cloning 기술은 In-Fusion 효소를 이용해 DNA 단편간의 말단 15 base의 상동서열을 fusion 시켜 cloning 하는 기술이다. 사용하는 vector의 말단 서열을 이용하여 cloning 하기 때문에 모든 vector를 사용할 수 있으며, 추가로 어떤 서열도 첨가되지 않는다. 양쪽말단의 서열을 인식하므로 방향성 있는 cloning이 가능하다.

원리와 특징

- Insert 종류, cloning 부위, vector에 구애받지 않는 directional cloning
- 짧은 단편부터 긴 단편(50 bp~15 kb)까지 효율적으로 cloning 가능
- 1회의 반응으로 여러 DNA 단편을 동시에 cloning 가능
- In-Fusion 반응 시간은 불과 15 분



① In-Fusion 효소는 DNA 단편의 말단 15 base의 상동서열을 이용하여 fusion 시키기 때문에 vector의 cloning할 위치의 양측 15 base와 각각 상보적인 서열을 부가한 primer로 목적 유전자를 PCR 증폭한다.

② 제한효소 처리 또는 inverse PCR에 의해 linear vector를 준비하여, ①의 PCR 산물※과 In-Fusion 효소를 혼합한다.
※ 비특이적인 증폭이 있는 경우에는 spin column 정제를, single band의 경우는 Cloning Enhancer로 처리해서 사용한다.

③ In-Fusion 반응(50℃, 15 분): directional cloning 완료

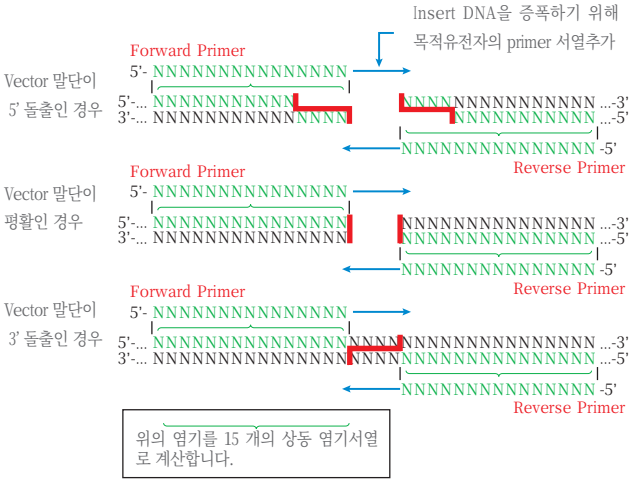
[실험방법]

(상세한 프로토콜은 반드시 제품의 사용설명서를 확인해 주세요)

1. Linear Vector 와 Insert DNA의 조제

① 사용하는 vector와 cloning 부위를 결정해 제한효소 처리 또는 inverse PCR로 vector를 선형화한다. : linear vector 용액 [A]

② Insert DNA의 PCR 증폭을 위한 In-Fusion Primer를 설계한다



In-Fusion 효소는 각 DNA 단편 말단 15 base의 상동 서열을 인식해 fusion 시킨다. 그러므로 insert를 PCR로 증폭할 때 사용하는 primer의 5' 말단에 linear vector의 말단 서열과 상동의 15 base를 추가하는 것이 핵심이다. 위의 그림과 같이 linear vector의 말단 서열에 맞춰서 In-Fusion Primer를 설계해야 한다. 덧붙여 In-Fusion Cloning 반응은 TA Cloning과 달리 증폭 산물의 A-overhang의 유무에 의한 영향을 받지 않기 때문에 PCR 증폭 산물의 A-overhang을 고려하지 않아도 된다.

③ Insert DNA를 PCR 증폭한다.
CloneAmp HiFi PCR Premix를 이용했을 경우

CloneAmp HiFi PCR Premix	12.5 μℓ
FW Primer/RV Primer	각 0.2~0.3 μM
주형	< 100 ng
dH_2O	up to 25 μℓ

98℃ 10 sec.
55℃ 5 sec. (또는 15 sec.)
72℃ 5 sec/kb
30 ~ 35 cycles

Primer 디자인 온라인 사이트

편리한 In-Fusion primer 디자인 사이트
(In-Fusion Primer Design Tool)를 이용하십시오.

다카라코리아 홈페이지 또는 Clontech 홈페이지 참조

2. Agarose gel 전기영동으로 PCR 증폭산물 확인

① 전기영동의 결과에 따라서 아래와 같이 insert DNA를 정제한다

- 비특이적 PCR 산물이 증폭된 경우 :
  - 목적 band만을 잘라 NucleoSpin Extract II를 이용하여 spin column 정제를 한다.
- 정확한 단일 band의 PCR 산물인 경우 :
  - Cloning Enhancer 처리 :

PCR 반응액	5 µℓ
Cloning Enhancer	2 µℓ
⇒ 37 ℃, 15 분 → 80 ℃, 15 분	

② Insert DNA 용액 [B]로 한다

3. In-Fusion Cloning 반응

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 µℓ
Linear Vector [A]	x µℓ
정제/ CE 처리 후 PCR 단편 [B]	y µℓ
dH_2O	up to 10 µℓ

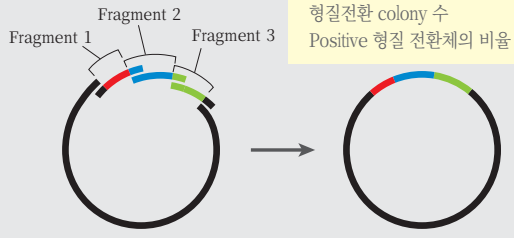
50 ℃ 15 분 반응 후 바로 얼음에 꽂는다.

4. 대장균으로의 형질전환

Stellar Competent Cells(Code 636763)이나 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code 9128) 등 형질전환 효율이 1×10^8 cfu/µg plasmid DNA 이상의 competent cell 사용을 추천한다

5. Insert Check PCR, 배양, Plasmid 정제

Insert check PCR은 31페이지를 참조한다.



형질전환 colony 수	415
Positive 형질 전환체의 비율	7/10

In-Fusion Cloning이라면 multi-fragments cloning도 효율적으로 실시할 수 있다. 각 1 kb의 DNA 단편을 In-Fusion HD Cloning Kit를 이용해 cloning한 후, colony PCR로 insert를 확인하였더니, 10개 clone 중 7개 clone가 positive clone임을 확인할 수 있었다.

Code	제품명	용량	포함제품			
			CE*a	NS*b	Cell*c	PCR 효소*d
639642	In-Fusion HD Cloning Kit w/Competent Cells※	10 rxns			o	
638909	In-Fusion HD Cloning Plus※	10 rxns		o	o	o
638916	In-Fusion HD Cloning Plus CE※	10 rxns	o		o	o
639648	In-Fusion HD Cloning Kit※	10 rxns				
638912	In-Fusion HD EcoDry Cloning Plus※	8 rxns		o	o	o

※ Premix 타입의 In-Fusion HD에는 10rxns 이외에 50 rxns, 100 rxns 제품도 있다.
※ In-Fusion HD EcoDry Cloning Plus는 동결건조 타입(실온, desiccator내 보존가능)이다. Micro-tube에 분주되어 있어 즉시 사용할 수 있으며, 24 rxns(8 well tube×3개), 96 rxns (96 well plate)도 있다.

In-Fusion HD 포함제품

*a. Cloning Enhancer (CE)

PCR 산물이 단일 band인 경우에 증폭 산물을 그대로 In-Fusion 반응에 이용하기 위한 전처리 시약이다. 이 처리를 하면 PCR에 사용한 primer나 주형 plasmid, dNTP의 영향을 받지 않고, In-Fusion 효소가 최대의 성능을 나타낼 수 있다.

*b. NucleoSpin Extract Ⅱ (NS)

PCR 산물이 multi-band인 경우에 gel extraction과 PCR clean-up을 동시에 할 수 있는 spin column이다.

*c. Stellar Competent Cells (Cell)

높은 형질전환 효율을 갖는 competent cell로 긴 단편 plasmid DNA 형질전환에도 높은 효율을 얻을 수 있고 같은 유전자형의 다른 competent cell과 비교시 colony 형성 속도가 빠르다. pUC계 plasmid의 형질전환 시에는 β-galactosidase의 α-상보성을 이용해 X-Gal을 첨가하면 재조합체의 Blue/White 선별을 할 수 있다.

*d. CloneAmp HiFi PCR Premix (PCR 효소)

CloneAmp HiFi polymerase와 dNTP, buffer가 모두 포함된 편리한 2 X master mix 제품으로 높은 정확도와 뛰어난 증폭 효율을 지닌 high fidelity PCR 효소이다. 이 효소를 이용하면 최대 10kb까지 증폭할 수 있으며 에러율이 매우 낮아 In-Fusion PCR Cloning에 매우 이상적이다.

License Notice [K20]

In-Fusion Cloning 기술과 High Fidelity DNA Polymerase를 이용한 다양한 Cloning 적용 예

실험예 1 : 제한효소 사이트가 없는 위치에 목적 단편의 클로닝

High fidelity PCR 효소인 PrimeSTAR Max(Code R045A)로 목적 단편을 증폭하고 In-Fusion 방법으로 클로닝하면 복잡한 클로닝 과정없이 간편하게 돌연변이 없는 목적유전자를 가진 클론을 얻을 수 있다. 본 실험에서는 제한효소 사이트가 없는 단백질 발현 vector의 개시코돈 ATG 위치에 MAP1LC3B 유전자를 부가적인 염기의 첨가없이 클로닝한 예이다 (그림 1).

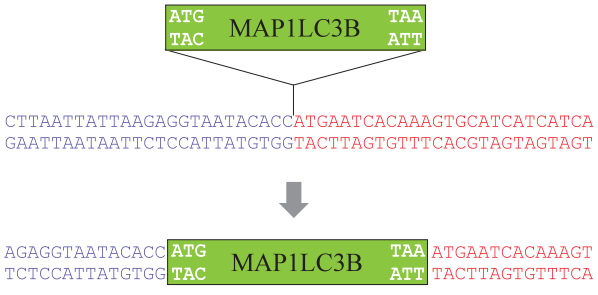


그림 1. MAP1LC3B 유전자의 클로닝 개요

제한효소 사이트가 없는 발현 vector의 개시코돈 ATG의 위치에 MAP1LC3B 유전자를 클로닝하였다.

방법

발현 vector(4.4 kb)를 주형으로 vector의 개시코돈 ATG의 상류와 하류로 설정한 vector 서열에 상보적인 프라이머와 PrimeSTAR Max를 이용하여 inverse PCR을 통해 vector를 선형화하였다. HL60 유래 cDNA를 주형으로 In-Fusion 반응용 프라이머[A]와 PrimeSTAR Max를 이용해 0.4 kb의 MAP1LC3B 유전자의 ORF를 증폭해 목적 유전자로 준비했다. 전기영동으로 vector와 insert이 각각 단일 밴드임을 확인하였고[B], 이 PCR 산물을 Cloning Enhancer로 처리한 후 In-Fusion cloning 반응을 실시했다 (그림 2). 형질전환에는 Stellar Competent Cells(Code 636763)을 사용했다.

[A] Gene specific primer의 5' 말단에 vector 말단과 상보적인 15 bp를 추가한 In-Fusion용 프라이머(40 mer, 39 mer)를 설계했다.

[B] PCR 산물이 복수 밴드인 경우에는 agarose gel에 전기영동한 후 목적 DNA만 추출, 회수, 정제하여 In-Fusion 반응에 이용한다.

결과

In-Fusion 반응액 중 1/5을 배양하여 1202개의 형질전환 콜로니를 확보하였고, 그 중 임의로 선택한 12개의 클론을 colony PCR을 통해 insert를 검사한 결과 12개 모두 목적 사이즈의 DNA가 클로닝되었음을 확인하였다 (그림 3).

PCR 증폭하여 목적 DNA와 vector를 선형화한다.
목적 DNA PCR에는 vector의 말단 서열 15bp가 부가된 프라이머를 사용

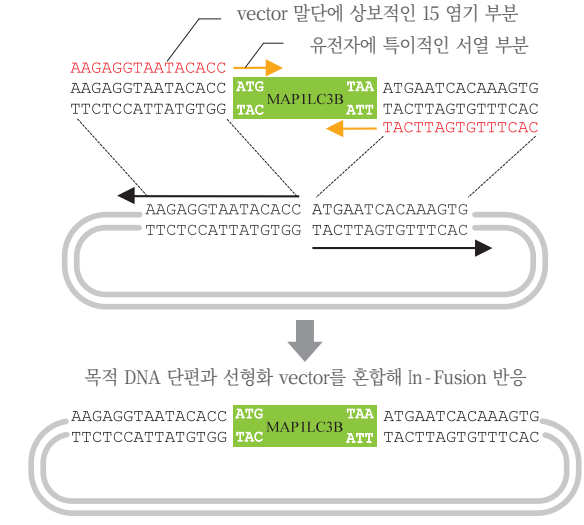


그림 2. MAP1LC3B 유전자 단편과 선형화 vector의 제작

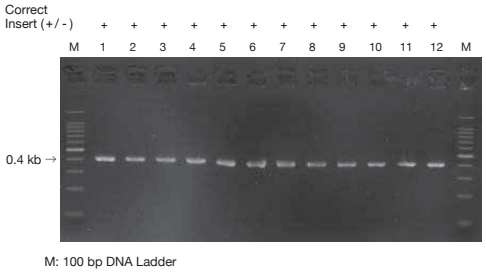


그림 3. Colony PCR에 의한 insert(0.4 kb) 확인 결과

실험예 2 : 긴 DNA 단편(12 kb)의 클로닝

높은 정확성과 긴 단편 증폭 능력이 있는 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(Code R050A)와 In-Fusion PCR Cloning Kit w/ Competent Cells(Code 639642)을 사용하면 긴 DNA 단편이나 GC rich 영역을 증폭하여 간편하게 클로닝할 수 있다. 본 실험에서는 PrimeSTAR GXL로 증폭한 12kb의 DNA 단편을 pUC19에 클로닝한 예이다.

방법

pUC19 vector는 PrimeSTAR Max로 inverse PCR을 통해 선형화하였다. 인간 게놈 DNA를 주형으로 pUC19 vector의 말단과 15 bp와 상보적인 서열을 가진 프라이머와 PrimeSTAR GXL을 이용하여 12 kb의 목적 DNA 단편을 증폭하였다. Vector와 동일하게 단일밴드는 In-Fusion 제품내 포함된 Cloning Enhancer로 처리한 후 In-Fusion 반응을 하였고 형질전환에는 Stellar Competent Cells을 사용했다.

결과

In-Fusion 반응액의 1/5을 배양한 결과 327개의 형질전환 콜로니를 확보하였고, 그 중 임으로 선택한 10개의 클론을 colony PCR을 통해 insert를 검사한 결과 10개의 클론 모두 목적 사이즈의 DNA가 클로닝 되었음을 확인하였다 (그림 4).

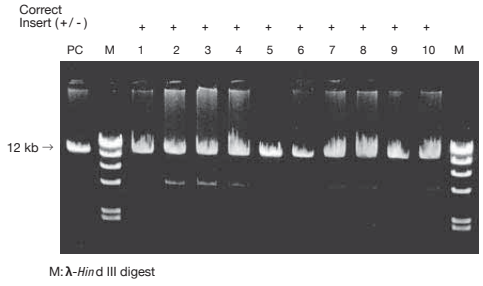


그림 4. PrimeSTAR GXL 를 이용해 insert(12 kb) 확인 결과

실험예 3 : 복수 단편의 동시 클로닝에 적용

In-Fusion PCR Cloning Kit의 프로토콜에 따라 PCR로 증폭한 목적 DNA 단편을 Cloning Enhancer로 처리(37℃, 15 분/ 80℃, 15 분) 후, 목적 DNA 단편과 선형화 vector로 In-Fusion 반응(50℃, 15 분)을 실시한다. 이번 실험에서 소개하는 간편 프로토콜은 목적 DNA와 vector를 모두 PrimeSTAR Max로 PCR 증폭해 선형화한 후 증폭된 목적 DNA 단편과 선형화된 vector를 먼저 혼합한 다음, 이 혼합액에 Cloning Enhancer 처리와 In-Fusion 반응을 1 tube에서 동시에 실시(37℃ 15분, 50℃ 15 분)한 후 형질전환하여 클론을 얻는 방법이다 (그림 5).

[표준 프로토콜] 약 60 분

PCR 증폭한 목적 DNA 단편
↓
CE처리: 37℃ 15 분, 80℃ 15 분
↓
제한효소로 선형화 vector DNA와 CE처리한 목적 DNA 단편 혼합
↓
In-Fusion 반응: 50℃ 15 분
↓
형질전환

[간편 프로토콜] 약 30 분

PCR로 선형화 vector DNA 와 PCR 증폭한 목적 DNA 혼합
↓
CE처리 & In-Fusion 반응 : 37℃ 15 분, 50℃ 15 분
↓
형질전환

*CE : Cloning Enhancer

그림 5. In-Fusion 클로닝의 표준 프로토콜과 간편 프로토콜. 제한효소로 선형화한 vector를 이용하는 경우 목적 DNA 단편의 Cloning Enhancer 처리와 In-Fusion 반응은 따로 실시해야 하지만, PrimeSTAR Max로 vector와 목적 DNA 단편을 PCR 증폭하여 모두 단일밴드인 경우 CE 처리와 In-Fusion 반응을 동시에 실시할 수 있다.

방법

PrimeSTAR Max를 이용해 inverse PCR로 선형화된 pUC19 vector를 만들었고 목적유전자는 In-Fusion용 프라이머와 PrimeSTAR Max를 이용해 β-globulin 유전자 1 kb와 2 kb를 각각 PCR 증폭했다. Vector를 포함한 3개의 증폭된 단편을 표준 프로토콜(각각 CE처리 후 In-Fusion 반응)과 간편 프로토콜(3개의 DNA 단편을 섞어 CE처리와 In-Fusion 반응을 1tube에서 진행)로 In-Fusion 클로닝을 실시했다 (그림 6). 형질전환에는 Stellar Cells을 사용했다. 복수의 DNA 단편이 클로닝 되었는지 확인은 colony PCR을 통해 3 kb 단편의 증폭 여부로 확인하였다.

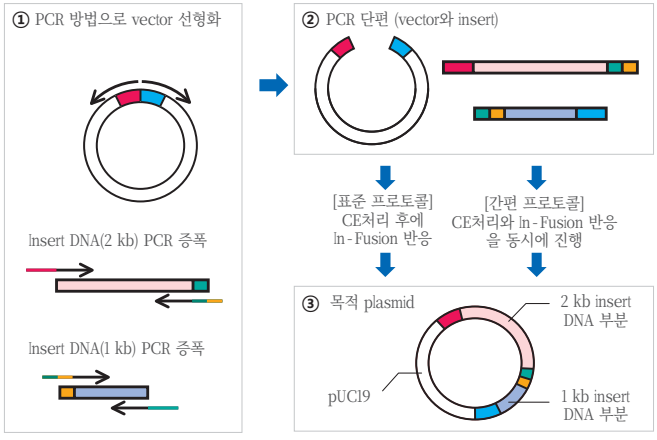


그림 6. 표준 프로토콜과 간편 프로토콜로 각각 반응하여 2개의 insert을 동시에 클로닝

결과

표준 프로토콜 In-Fusion 반응액과 간편 프로토콜 In-Fusion 반응액의 1/5을 각각 배양하였고 표준 프로토콜에서는 112개의 형질전환 콜로니를 확인하였고 간편 프로토콜에서는 407개의 형질전환 콜로니를 얻었다. 그 중 임의로 선택하여 insert를 확인한 결과, 두 프로토콜 모두 조사한 12 클론 중 9 클론이 2개의 목적단편이 동시에 클로닝된 것을 확인할 수 있었다 (그림 7).

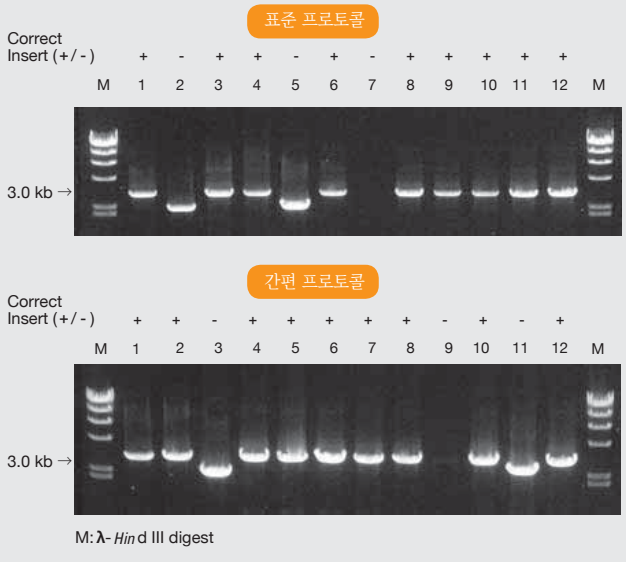


그림 7. 콜로니 PCR을 이용한 insert(3 kb)의 확인 결과. 표준 프로토콜의 Lane 2, 5와 간편 프로토콜의 Lane 3, 11에서 보이는 작은 단편은 PCR 증폭시의 비특이적 증폭산물이 클론닝된 것으로 생각된다.

역전사 효소 & cDNA 합성

정제된 RNA로부터 RT-PCR 또는 library를 제작할 경우, 우선 역전사 효소(Reverse Transcriptate: RTase)를 이용해 cDNA를 합성한다.
본 고에서는 MMLV유래의 RTase로 1st strand cDNA 합성을 위한 일반적인 방법을 소개하고자 한다.

현재 연구용 시약으로 사용되고 있는 역전사효소에는 avian myeloblastosis virus(AMV)에서 유래한 것과 moloney murineleukemia virus(M-MLV)에서 유래한 2종이 있다. 기존에는 mRNA 고차구조 때문에 열안정성이 높은 AMV RTase가 주로 사용되었지만, 최근 MMLV 유래의 개량형 효소(PrimeScript RTase 등)들의 성능이 향상되면서 MMLV 유래의 역전사 효소 사용이 주류를 이루고 있다.
또한 역전사효소를 이용한 cDNA 합성에서는 RNA와 annealing 위치에 따라 3종류의 primer를 사용할 수 있다.

- Oligo dT primer: mRNA의 polyA tail에 annealing되어, 3' 말단에서부터 cDNA를 만든다.
- Random primer(일반적으로 6nt~ 9nt 정도): mRNA의 모든 영역에서 cDNA 합성을 시작한다.
- Gene specific primer: 목적 cDNA만을 합성한다.

[실험방법]
1st strand cDNA 합성

PrimeScript Reverse Transcriptase 사용의 경우

① Tube에 주형 RNA/Primer 혼합액을 조제한다.

Oligo dT primer	50 pmol
(또는 Random primer (6 mers)	50 pmol)
(또는 Gene specific primer	2 pmol)
dNTP mixture (10 mM each)	1 μℓ
Total RNA*1	≦ 5 μg
(또는 mRNA	≦ 1 μg)
RNase free dH_2O	up to 10μℓ

② 65℃에서 5 분간 incubation 후, 얼음에서 급냉한다.*2

③ 아래의 반응액을 더하여 total 20 μℓ로 한다.

① 반응액 : 주형 RNA/Primer Mixture	10 μℓ
5X PrimeScript Buffer	4 μℓ
RNase Inhibitor	20 units
PrimeScript Reverse Transcriptase	100~200 units
RNase free dH_2O	up to 20 μℓ

④ 가볍게 votex한다.
⑤ 아래의 조건으로 반응한다.

Option (30℃	10 min) *3
42℃ (~ 50℃) *4	30 ~ 60 min

⑥ 70℃에서 15 분간 incubation 후 얼음에서 냉각한다.

위와 같은 조건으로 반응하여 생성된 1st strand cDNA는 PCR의 주형 또는 2nd strand cDNA 합성 반응에 사용할 수 있다.

체크 포인트

*1 성공적인 cDNA 합성을 위해서는 순도가 높은 RNA 샘플을 얻는 것이 중요하다. 그러므로 세포내에 포함되어 있는 RNase의 작용을 억제하는 것과 사용하는 기구나 용액 등 외부에서의 RNase의 오염을 피해야 한다. RNA 조제시 실험자의 땀이나 타액에 포함된 RNase의 오염을 막기 위해서 작업 중 불필요하게 이야기하지 않고, 청결한 disposable 글로브 착용을 권장한다.

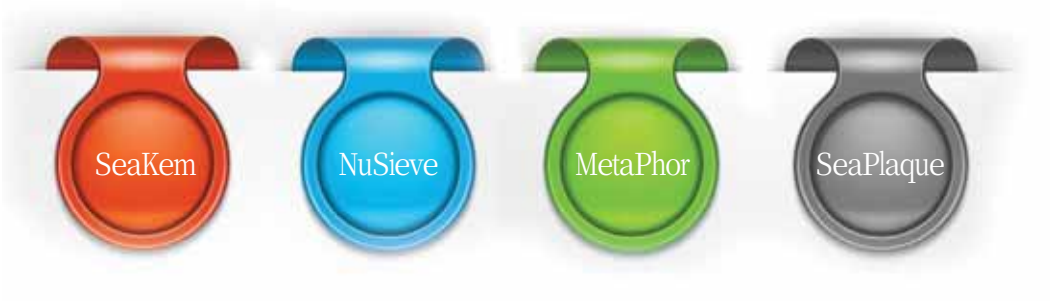
*2 열변성 처리에 의해 RNA의 고차구조를 제거한다.

*3 Random primer 사용시 필요하다.

*4 RNA의 분해를 방지하기 위해서는 장시간의 고온처리를 피하는 것이 바람직하다. 최근 MMLV 유래 개량형 RTase의 성능이 향상되어 42℃에서 반응하더라도 RNA 고차구조에 의한 신장 반응 저해가 나타나지 않는 PrimeScript RTase와 같은 효소들이 많이 개발되었다.

[관련제품 리스트]

구분	Code	제품명	용량
최고품질의 1st strand cDNA의 합성	6210A	PrimeScript Ⅱ 1st strand cDNA Synthesis Kit	50 회
	6110A	PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit	50 회
범용적인 RT PCR kit	RR014A	PrimeScript RT-PCR Kit	50 회
	RR055A	PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2	50 회
Full-length cDNA 합성	634925	SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit	10 회
탁월한 신장 능력을 가진 역전사 효소	2680A	PrimeScript Reverse Transcriptase	10,000 U
RNA 정제	9767A	TaKaRa MiniBEST Universal Extration Kit	50 회
	9109	RNAiso Plus	200 ml

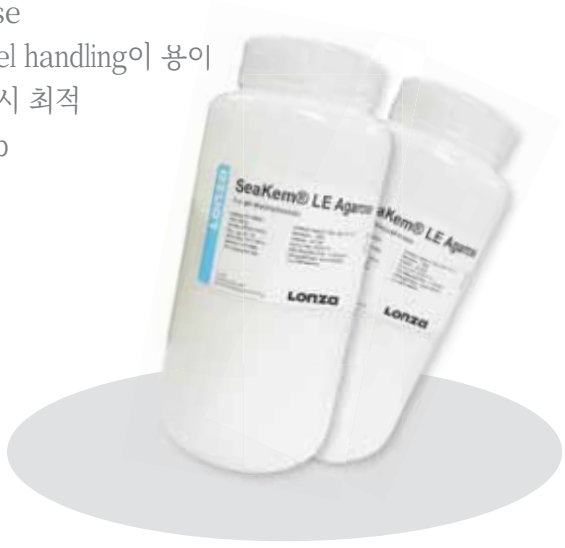


Lonza

Agarose의 대명사
명품 Lonza agarose

가장 standard하고 범용적으로 사용가능한
SeaKem LE agarose

- 다양한 목적에 활용가능한 agarose
- Gel 강도가 뛰어나 blotting시 gel handling이 용이
- 1 kb 이상의 PCR 산물 확인시 최적
- 분석범위 : 100 bp~23 kb



Lonza Agarose 선택가이드

실험목적에 맞는 agarose를 선택하면 조건설정 시간을 단축하고 실험효율을 극대화 할 수 있다.

DNA 단편 크기	≤ 1 kb	≥ 1 kb	1 kb~ 50 kb
Standard 분석	NuSieve 3:1 Agarose	SeaKem LE Agarose	SeaKem Gold Agarose
최고의 해상도	MetaPhor Agarose	-	-
Blotting	NuSeieve 3:1 Agarose	SeaKem LE Agarose	SeaKem Gold Agarose
In-gel 반응	NuSieve GTG Agarose*	SeaPlaque GTG Agarose*	SeaPlaque GTG Agarose*
DNA 회수	NuSieve GTG Agarose*	SeaPlaque GTG Agarose*	SeaPlaque GTG Agarose*
	SeaKem GTG Agarose	SeaKem GTG Agarose	SeaKem Gold Agarose

* Low Melting Temperature : 일반 agarose의 melting 온도가 90℃ 이상 인데, Low Melting Temperature는 65℃ 이하에서 melting되기 때문에 DNA와 RNA 회수나 in-gel 반응 적용에 유리하다.

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST 시리즈 출시

RNA Purification

gDNA Eraser Column 채용으로 고순도 Total RNA 추출

TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit

AGPC 법으로 다량의 Total RNA 추출

* RNAiso Plus (Total RNA extraction reagent)
* column type이 아닌 AGPC(Acid Guanidium Phenol Chloroform) 방법 적용

DNA Purification

Plasmid 정제를 위한

TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0

PCR 산물, 제한효소처리 산물 정제를 위한

TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0

실온에서 Gel을 녹이는 강력한 DNA 추출 Buffer를 채용한

TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0

고효율 gDNA 추출을 위한

TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0

that's GOOD science!

Utilizing the Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent to Avoid Off-Target Effects of RNAi

Peter W. Roelvink* and David A. Suhy*
* Currently with Clontech Laboratories, Inc.

Work performed while at Benitec Ltd.,Hawthorne East, Australia

RNA interference(RNAi)의 발견은 포유류 유전자 발현을 억제할수 있게 되었고 유전자 발현을 억제하여 유전자 기능을 연구하는 방법으로 연구자들에게 선호 되었다. 또한 RNAi 기술은 다양한 치료제 개발에서 엄청난 가능성을 보여줬으나 RNAi 염기서열이 특정 타겟을 억제하지 않고 다른 유전자도 억제한 경우(off-target effect)도 종종 보고되었다. Clontech은 빠르고 저렴하게 off-target을 방지하면서도 virus를 타겟으로 하는 RNAi 치료제 개발 분야에서 이용할 수 있는 방법을 찾았다.

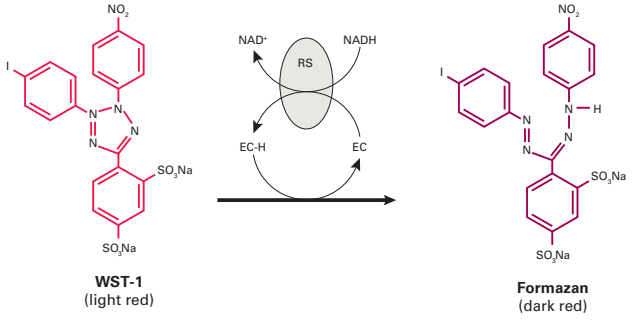


그림 1. Chemical structure and cleavage of the tetrazolium salt WST-1 to formazan. Once in the interior of active cells, WST-1 is reduced by mitochondrial succinate-tetrazolium reductase to produce the colorimetrically differentiated formazan product. EC = electron coupling reagent. RS = mitochondrial succinate-tetrazolium reductase system

간염(Hepatitis C) 치료를 위한 RNAi 치료제 개발

미국 질병관리본부 통계에 따르면 400만명 이상의 미국인이 간염 바이러스(hepatitis C virus(HCV))에 감염되었다. 또한 세계보건기구에 따르면 전세계적으로 1억 4천명 이상 감염되었고 몇몇 국가에서는 감염율이 20%로 높게 나타났다. HCV는 single RNA로 세포질에서 감염주기가 진행되기 때문에 RNAi 기반의 치료제 연구에 적합하다.

RNAi의 off-target 현상

RNAi의 off-target을 방지하는 것은 세포내 독성을 방지하고 RNAi 실험 결과를 정확하게 해석하기 위해 매우 중요하다. RNAi 제작시 off-target 발생을 최소화 하기 위해 BLAST와 Smith-Waterman 분석과 같은 다양한 알고리즘이 도입되었지만, 실험 결과를 통해 bioinformatics방법은 off-target 방지책이 아니라는 것이 확인되었다[1]. 반면 3'의 UTR에 있는 short seed sequences의 확인으로 off-target 될 가능성을 실제보다 높게 평가했다는 주장이 있다. 직접적인 RNAi 특이성 정보를 얻기 위해 genome-wide expression 변화를 확인하는 microarray 분석을 진행하였다. 그러나 이 분석법은 복잡하고 많은 시간이 소요되며, 많은 후보 RNAi를 스크리닝 하기에 가격적인 부담이 있다. 이를 해결하고자, Clontech은 off-target 현상을 저렴한 가격으로 빠르게 스크리닝 할 수 있는 방법을 개발하였다. Off-target 현상은 세포 증식 억제나 독성과 같은 세포 활성의 변화가 나타나기 때문에, 세포 활성 모니터링을 통해 RNAi 영향력을 Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent (Code 630118)로 확인할 수 있다. 이러한 비색 분석은 tetrazolium salt WST-1(밝은 빨강색)이 분해되어 formazan(어두운 빨강색)이 되는 특징을 이용한 것이다(그림 1)[4]. 이 반응은 살아있는 세포의 미토콘드리아 환원효소에 의해 일어나며, multiplate reader를 이용하여 흡광도 420-480nm(A_{max}=450 nm)로 측정할 수 있다. Formazan 생산량은 대사작용이 활성화되어 있는 세포와 비례한다.

간염(Hepatitis C) 치료제 개발을 위한 후보 RNAi 서열 확인

대다수의 RNA 바이러스가 복제과정에서 돌연변이가 잘 발생하기 때문에, 서열 특이적인 RNAi를 기반으로 한 항바이러스제의 개발이 어렵다. 수백개의 viral isolate의 보존서열로부터 모든 HCV 유전자형에서 특이적으로 적용되는 30개의 RNAi 후보를 선발하였다. 각 후보 RNAi의 발현 억제 기능을 확인하기 위해 siRNA duplexer를 합성하였다. 최근까지 조직을 이용한 HCV 증식이 어려웠기 때문에 siRNA는 HCV replicon 모델이나 reporter assay와 같은 다른 시스템을 이용하여 연구되었다. Reporter assay는 세포에 luciferase reporter plasmid를 co-trasfection하여 siRNA 활성을 확인하는 방법으로, HCV의 약 100bp 서열이 luciferase open reading frame의 하위부분과 poly A tail 상류부분에 삽입된다(그림 2). 이후, 삽입된 서열에서 luciferase reporter mRNA가 절단되므로 luminescence가 감소된다. 감소한 luminescence를 측정하여 RNAi 저해 효과를 확인할 수 있다.

Clonetech은 firefly luciferase와 Ready-To-Glow Secreted Metridia Luciferase를 도입하였다. Luciferase-based reporter와 replicon system assay를 이용하였을 때, 30개 siRNA 중 20개 siRNA가 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 그 후, 후보 siRNA는 기능항진으로 알려진 농도에 따른 RNAi 억제 능력을 바탕으로 순위를 정했다. 후보 유전자를 줄이기 위해, Premixed WST-1 Cell Pro-liferation Reagent를 이용하여 저렴하고 빠르게 off-target된 siRNA를 제거하였다.

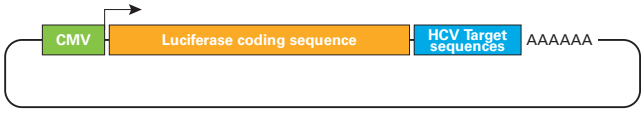


그림 2. Luciferase reporter system for assaying RNAi activity. The reporter was constructed by fusing HCV sequences (~100 nucleotides of contiguous viral sequence) downstream of the luciferase reading frame but upstream of the poly A sequence.

특히 세포내 타겟 유전자를 억제시키면 세포 독성과 활성 억제를 나타내는 siRNA를 중점으로 진행하였다. 실제로 세포 분화에 필수적인 유전자 확인을 위해 진행한 RNAi based screening에서(Kittler *et al.*) WST-1 assay를 이용하였다. 이 연구는 15,497 인간 유전자 cDNA library를 이용하여 제작된 endoribonuclease-prepared short interfering(esi) RNA genome-scale library를 스크리닝하여, 세포 활성을 억제 시키는 RNAi를 확인하였다[5]. 실제 세포 내에는 바이러스 염기서열이 존재하지 않기 때문에, 감염되지 않은 세포에서 바이러스 특이적 siRNA로 인한 세포활성 감소는 세포 내 유전자의 억제로 인한 결과와 같다고 판단하였다.

WST-1 assay의 감도와 측정범위를 테스트하기 위해 감염시키지 않은 Huh-7 세포를 다양한 농도로 준비한 후, 72 시간 동안 세포 배양하여 WST-1 assay를 진행하였다. 그 결과, 농도 차이에 따라 세포 활성 정도가 확연하게 나타나 간편하게 구별 가능했다(그림 3).

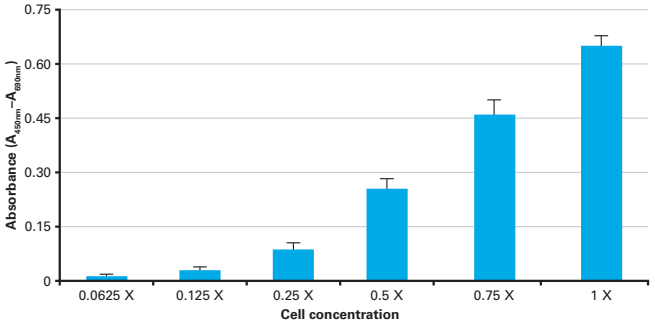


그림 3. Ability of WST-1 reagent to detect differences in proliferating cells. Huh-7 cells were plated at differential densities and allowed to grow for an additional 72 hr prior to performing the WST-1 assay. Measurements are the averages of n = 4 independent samples ± standard deviation.

RNAi 후보군을 스크리닝할 때 전반적인 target-specific 저해 효과를 확인하기 위해 각각의 siRNA와 적절한 luciferase fusion reporter를 보유한 plasmid를 co-transfection 하였다. Co-transfection을 하는 이유는 transfection의 효율을 측정하기 위해 활성을 normalize 시키기 위함이다. Reporter 기능이나 세포 활성을 억제하지 않던 non-specific siRNA를 negative control로 이용하였다. 네 개의 siRNA는 대표적인 데이터로 그림 4에 나타냈다. 모든 siRNA가 luciferase reporter 감소가 나타나지만, 4개중 2개(siRNA-23, siRNA-24)의 siRNA에서 WST-1 활성이 눈에 띄게 감소되었고 이는 세포 활성 억제로 인한 것을 의미한다. 이러한 결과를 바탕으로 HCV 치료제를 개발하는 과정에서 이 2개의 RNAi를 미리 제거할 수 있었다.

Clontech은 빠르고 저렴한 스크리닝 방법인 WST-1 Premixed Cell Proliferation Reagent를 이용하여, 세포 증식 억제나 독성로 인한 세포 활성 감소를 이용하여 RNAi의 off-target 효과를 확인하였다. 이 방법을 이용하면, 시간과 비용이 많이 필요한 치료제 개발과정에서 손쉽게 불필요한 후보 siRNA를 제거할 수 있다.

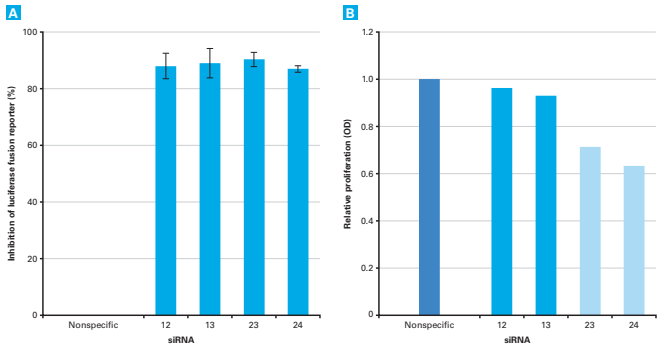


그림 4. Assessment of nonspecific siRNA toxicity using WST-1. Panel A. Inhibition of specific luciferase-HCV reporter plasmid activity in Huh-7 cells 72 hr after cotransfection with the cognate siRNA (n = 4 independent transfections). The data were normalized for transfection efficiency by inclusion of a second expression plasmid encoding Renilla luciferase in the transfection mixture. Inhibitory activity was calculated based on comparisons of parallel transfections that utilized a nonspecific control siRNA. The data are represented as the mean inhibition of luciferase activity relative to the nonspecific siRNA control ± standard deviation. Panel B. Assessment of the effects of the siRNA on cellular proliferation by the WST-1 assay. Absorbance readings were normalized to cells that had been transfected with the nonspecific control siRNA (n = 4 independent transfections).

제품 리스트

Code	제품명	용량
630118	Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent	2,500 rxns
631726	Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay	100 회
631727	Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay	500 회
631728	Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay	1,000 회
631729	Ready-To-Glow Secreted Luciferase pMetLuc Vector Kit	1 kit

License Notice [K24]

References :

1. Birmingham, A. *et al.* (2006) *Nat. Methods* 3(3):199–204.

2. Semizarov, D. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(11):6347–6352.

3. Jackson, A.L. *et al.* (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(6):635–637.

4. Slater, T.F. *et al.* (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 77:383–393.

5. Kittler, R. *et al.* (2004) *Nature* 432(720):1036–1040.

고속 PCR용 thermal Cycler

TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast

기기 개요

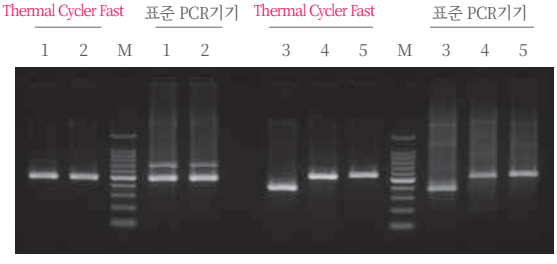
TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast는 금으로 도금한 silver block을 탑재하였으며, 최대 가열 속도는 8℃/sec 이고 최대 냉각 속도는 6℃/sec 로 표준 0.2 ml PCR tube를 사용하는 PCR 기기 중 최고의 온도 제어 능력을 가진 fast PCR용 thermal Cycler이다.
또한 고성능과 편리성을 겸비한 PCR 장치로 표준 PCR tube(0.2 ml)와 plate를 이용하기 때문에 별도로 전용 tube를 구매할 필요 없이 사용이 간편하며 고속의 온도 제어가 가능하다.

특징

- 금 도금된 silver block 탑재
- High-power peltier unit 탑재
- Tube나 plate에 맞추어 lid 히터 높이가 자동 조절
- 0.2 ml의 표준 PCR tube, plate 사용
- 5.7인치 color touch screen
- USB 인터페이스 탑재, USB 메모리에 프로그램 파일 보존 가능

비특이적 증폭의 감소

PrimeSTAR Max DNA Polymerase(Code R045A)를 이용해 비특이적 증폭 산물이 생기기 쉬운 target의 PCR 증폭을 실시하였다. Thermal Cycler Fast와 자사의 표준 PCR 장치로 증폭하여 비특이적 증폭의 정도를 비교했다. 그 결과, Thermal Cycler Fast에서는 비특이적 증폭이 감소함을 확인하였다.
TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast의 High-power Peltier에 의한 fast ramp 기능으로 ramping rate가 큰 폭으로 단축되기 때문에 primer의 misannealing이 감소하며, 결과적으로 비특이적 증폭이 감소된다.

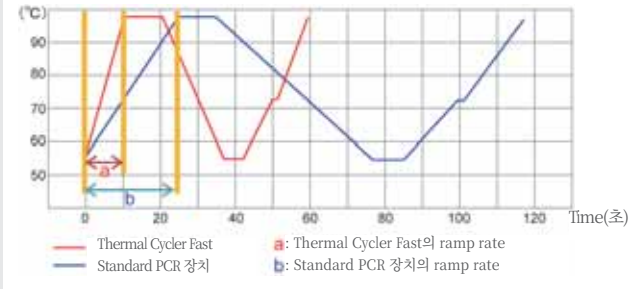


증폭사이즈:
1 : 480 bp 4 : 520 bp
2 : 480 bp 5 : 540 bp
3 : 380 bp M : 100 bp DNA ladder

PCR 조건:
98℃ 10 sec
55℃ 5 sec
72℃ 2 sec
35 cycles

Silver block(금 도금)에 의한 고속 온도 제어

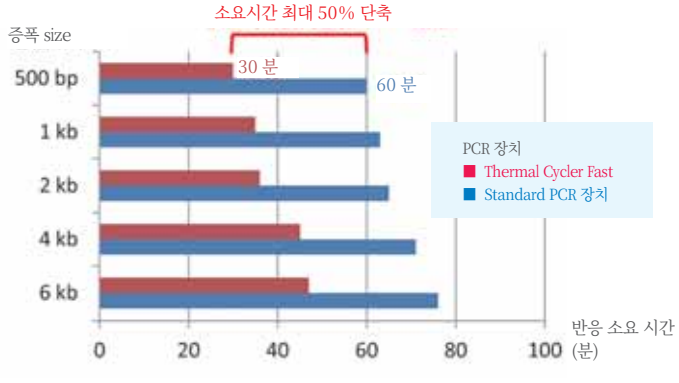
표준 PCR 장치와 고속 PCR 장치의 온도 변화 비교

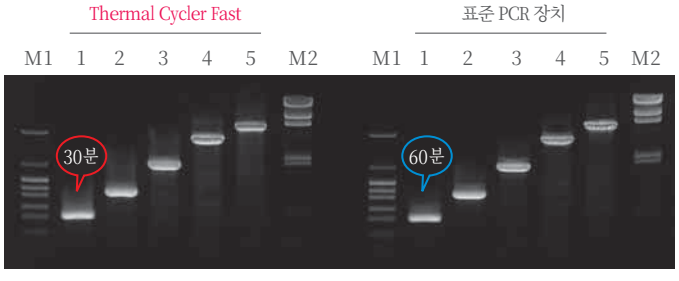


98℃ 10 초, 55℃ 5 초, 72℃ 2 초의 조건으로 ramping rate의 평균치를 나타냈다.

반응 시간 단축과 안정된 반응성

아래는 PrimeSTAR Max DNA Polymerase로 각 증폭 사이즈에 적합한 PCR 조건을 사용하여 단편을 증폭한 것으로 TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast와 표준 PCR장치(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice)의 PCR 반응 소요 시간을 비교했을 때, 500 bp에서 소요 시간을 절반으로 단축하였다. 또한 반응 시간을 절반으로 단축했음에도 불구하고 안정된 반응성을 확인했다. 일반적인 PCR 반응조건은 표준 PCR 장치에 최적화 되어 있기 때문에 고속 PCR로 반응시에 조건 검토가 필요하다





증폭사이즈 :

1 : 0.5 kb
2 : 1 kb
3 : 2 kb
4 : 4 kb
5 : 6 kb
M1: pHY Marker
M2: λ-Hind Ⅲ digest

PCR 조건 :

98℃ 10 sec
55℃ 5 sec
72℃ 5 sec
35 cycles

사양

TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast (Code TP450)	
외형 규격	286(W) X 362(D) X 290(H) mm
중량	12 kg
정격 전원 전압	AC 100 ~ 240 V, 47 ~ 63 Hz, 8 A (110 V일때)
가열 냉각 방식	Peltier
블록 재질	Silver block(금도금)
가열 속도	최대 8.0℃/sec
냉각 속도	최대 6.0℃/sec
온도 설정 범위	4℃ ~ 105℃
온도 정밀도	<±0.2℃(72℃)
온도 균일성	<±0.3℃(72℃)
실험 volume	10 ~ 50 µl(추천 : 20 ~ 30 µl)
Lid 가열 범위	~ 120℃
사용가능 tube	0.2 ml single tube, 0.2 ml 8 strip tube, 96 well plate
디스플레이	5.7" color touch screen(감압식)
저장 가능 프로그램 수	최대 30,000(내부 메모리카드)

추천 PCR효소

Code	제품명	용량
R045A	PrimeSTAR Max DNA Polymerase	100 회
R050A	PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	250 U
R080A	TaKaRa Taq HS Fast Detect	200 회

License Notice [L15, M54]

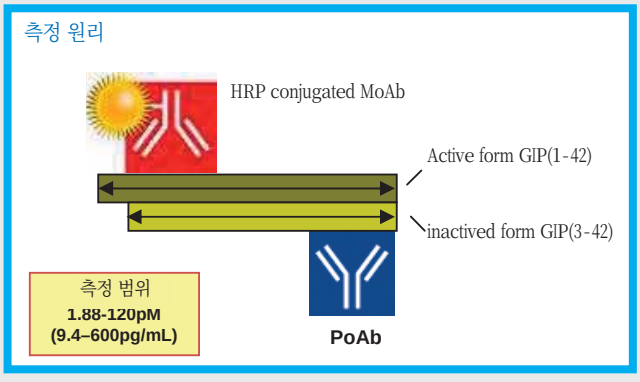
혈액 샘플에서 total GIP 측정 가능

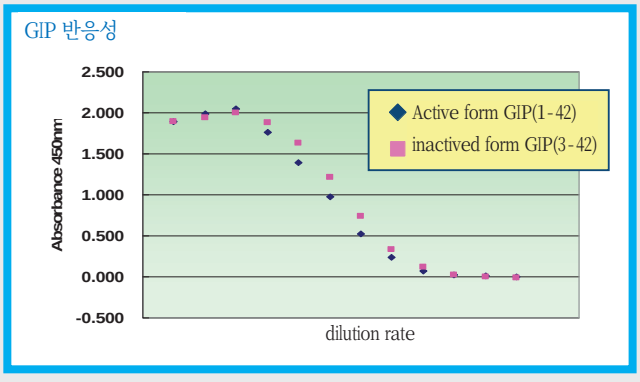
Human GIP, Total Assay Kit-IBL 출시

GIP(Glucose-dependent insulinotropic polypeptide)는 소장호르몬인 incretin의 한 종류로 랑게르한스섬 베타 세포에서 인슐린 분비를 촉진하며, 랑게르한스섬 알파 세포에서 glucagon의 분비를 억제한다.

이 키트를 이용하면 혈액 샘플에서 human GIP, active form (1-42)과 inactivated form (3-42)을 동시에 측정 할 수 있다.

Active form GIP와 inactive form GIP 동시 측정 가능





Code	제품명	Size	적용가능 샘플
27203-96Well	Human GIP, Total Assay Kit-IBL	96 well	Human EDTA-plasma (DPP-IV inhibitor), cell culture supernatant
27201-96Well	Human GIP, Active form Assay Kit - IBL	96 well	Human EDTA-plasma (DPP-IV inhibitor)
27764-96Well	Mouse GIP, Active form Assay Kit - IBL	96 well	Mouse EDTA-plasma (DPP-IV inhibitor)
27202-96Well	Rat GIP, Active form Assay Kit - IBL	96 well	Rat EDTA-plasma (DPP-IV inhibitor)
27784-96Well	GLP-1, Active form Assay Kit - IBL	96 well	Human, Mouse, Rat Plasma (DPP-IV Inhibitor), cell culture supernatant

신속하고 민감한 검출을 위한

Western BLoT 시리즈

Western blot 검출용 화학 발광 물질

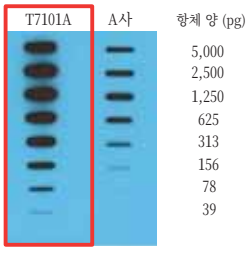
Western BLoT HRP Substrate 시리즈

Western BLoT HRP Substrate 시리즈는 Western blot에 사용된 horseradish peroxidase(HRP)-labeled 항체를 검출하기 위한 chemiluminescent substrates 이다.

Code	제품명	특징	검출방법	Membrane
T7101A	Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate	타사 동급의 ECL substrates 제품보다 발광이 강해 명료한 signal 검출 [검출한계: Picogram]	X-ray film	Nitrocellulose, PVDF
T7102A	Western BLoT Quant HRP Substrate	오랫동안 지속되는 안정한 발광. 높은 민감도와 정량성을 지님 [검출한계: Low picogram]	CCD camera, X-ray film	Nitrocellulose, PVDF
T7103A	Western BLoT Hyper HRP Substrate	소량의 항체로도 높은 감도의 검출 가능 [검출한계: Mid femtogram]	CCD camera, X-ray film	Nitrocellulose, PVDF
T7104A	Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate	가장 높은 민감도의 제품 [검출한계: Low femtogram]	CCD camera, X-ray film	Nitrocellulose, PVDF

- Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate(Code T7101A)와 타사 동급 HRP 기질을 이용하여 HRP-labeled 2차 항체(39 ~ 5,000 pg)의 발광 signal을 slot blot으로 검출했다.
- 항체: Goat Anti-Mouse IgG(H+L) Peroxidase conjugated
- Membrane: Nitrocellulose

※ Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate 사용시 명료한 signal을 검출했다.
(노출 시간 5초, X-ray 필름을 사용한 내부 비교 데이터)

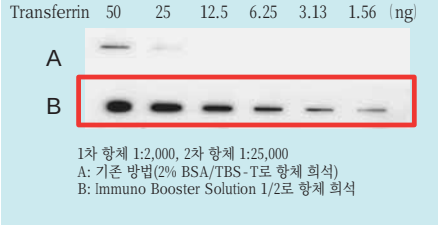


Western Blot Signal Enhancer(항원-항체 반응 촉진제)

Western BLoT Immuno Booster

Western BLoT Immuno Booster는 항원-항체간 특이적 반응을 촉진하여 Western blot 검출과 ELISA의 검출 감도를 높이는 시약이다.

- 기존 방법에 비해 4 ~ 10배 정도 감도 향상
- HRP 또는 AP 활성에 영향을 미치지 않아, 1차 항체 및 2차 항체를 희석하여 사용
- 비특이적 결합을 막고 백그라운드를 감소



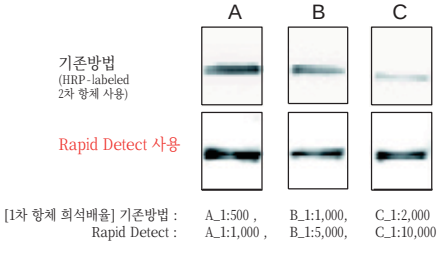
Code	제품명	용량
T7111A	Western BLoT Immuno Booster	각각 250 ml

HRP-labeled 2차 항체 없이 IgG 검출

Western BLoT Rapid Detect

Western BLoT Rapid Detect는 Western blot 검출시 antibody-free IgG Detector Solution(HRP-labeled)을 이용하여 1차 항체를 검출하는 시약으로, HRP-labeled 2차 항체가 불필요하다.

- HRP-labeled 2차 항체 없이 Western blot signal을 신속하게 검출
- Antibody-free IgG Detector Solution(HRP-labeled)으로 복수의 1차 항체를 동시에 검출 가능
- 1차 항체와 본 시약을 혼합하여 전사 후 1시간 만에 신속하게 검출 가능



Code	제품명	용량
T7121A	Western BLoT Rapid Detect	50회

K3 Advantage and Titanium PCR Products

K11 cPPT Element

K19 Hot Start Antibody

K20 In-Fusion Cloning Products

K21 Lentiviral Expression Products

K24 *Metridia* Luciferose

K25 Molecular Probes, Inc.

K27 One-Step RT PCR

K29 Retroviral Expression System

K31 PCR

K38 Retroviral Packaging Systems

K40 RNAi Products

K42 SMART Amplification Products

K45 Tet-Based Expression Products

K47 WPRE Technology

K62 Tranfection Polymers

K69 dsDNA-Binding Dye Research Kit

K72 SYBR/Melting Curve Analysis

K92 Suppression PCR

L15 Hot Start PCR

M54 PrimeSTAR HS DNA Polymerase

M57 LA Technology

P1 Roche Enzyme Kits

P7 PCR Notice

Exiqon Patent and Licensing Information

Exiqon, AQ-Link, LNA, miRCURY, Hy3, Hy5, miRPlus, ProbeLibrary, ProbeFinder and Genoview are registered trademarks of Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark.
자세한 내용은 www.Exiqon.com 참조 바란다.

Mirus Patent and Licensing Information

Use of Mirus Bio *Trans*IT® polyamine transfection reagents are covered by U.S. Patent No. 5,744,335, No. 6,180,784, No. 7,101,995, No. 7,601,367 and patents pending. The use of certain Mirus Bio transfection products are the subject of one or more of U.S. Patent No. 7,335,509, No. 7,655,468 and/or other pending U.S. patent applications. Mirus Bio Label IT® nucleic acid labeling and modifying reagents are covered by U.S. Patent No. 6,262,252, No. 6,593,465, No. 7,049,142, No. 7,326,780 and No. 7,491,538. Cy™3 and Cy™5 products or portions thereof are manufactured under license from Carnegie Mellon University and are covered by U.S. Patent No. 5,268,486.
자세한 내용은 www.Mirusbio.com 참조 바란다.